

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**NUEVOS MARCADORES BIOLÓGICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA  
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

**SARA VALERO GONZÁLEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**MADRID, 2010**



**SARA VALERO GONZÁLEZ**

**NUEVOS MARCADORES BIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA EN PACIENTES CON LUPUS  
ERITEMATOSO SISTÉMICO**

**DIRECTORES:** **Dr. MIGUEL YEBRA BANGO.** PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA.

**Dra. RAQUEL CASTEJÓN DÍAZ.** INVESTIGADORA DE LA FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA - CONSEJERÍA DE SANIDAD DE LA COMUNIDAD DE MADRID.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

2010



## *Agradecimientos*

En la realización de esta Tesis Doctoral han participado numerosas personas a las que quiero ofrecer mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directores de tesis, el Dr. Miguel Yebra Bango y la Dra. Raquel Castejón Díaz, por el esfuerzo y dedicación puestos en la realización de esta Tesis Doctoral. Al Dr. Miguel Yebra, por su incansable entrega a la Medicina y a la docencia y por confiar en mí este proyecto tan importante para él. A la Dra. Raquel Castejón, por sus consejos e ideas y por su inestimable ayuda, sin la cual, esta tesis no hubiera podido ser realizada. Gracias a los dos por darme la oportunidad de trabajar junto a vosotros.

Al Dr. Carlos Jiménez Ortiz, neurólogo del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, por su inestimable ayuda a la hora de realizar esta tesis. Por enseñarme los fundamentos de la elasticidad arterial y por realizar los estudios en los pacientes.

Al resto de componentes del Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes, a María Jesús Citores y especialmente a Silvia Rosado, por su enseñanza y ayuda técnica en el laboratorio.

A todos los componentes de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, al Dr. Juan Antonio Vargas, la Dra. Susana Mellor y el Dr. Pablo Tutor. Gracias a todos por vuestra ayuda, vuestras ideas y ganas de colaborar.

Agradezco así mismo a todos los miembros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda su ayuda y enseñanza a lo largo de todo este tiempo y por haberme ayudado a formarme como médico y como persona. A

Esther Montero por su amistad y apoyo incondicional y al resto de residentes por compartir conmigo todos esos buenos momentos.

A los miembros de la secretaría de Medicina Interna, por su colaboración a la hora de gestionar las citas de los pacientes.

Quisiera agradecer a Isabel Millán la ayuda prestada en la realización de los análisis estadísticos.

Por último, quisiera agradecer a mis padres la oportunidad que me dieron de estudiar Medicina, su cariño y su apoyo. A mi hermana, por sus cuidados y su inestimable ayuda. Y a Pablo, por inculcarme su espíritu investigador y sus ganas de estudiar, por apoyarme siempre, entenderme y por su cariño y ayuda. A ellos les dedico esta Tesis.

**A mis padres**  
**A mi hermana**  
**A Pablo**



## *Abreviaturas*

**AAS:** ácido acetil salicílico

**ACR:** American College of Rheumatology

**ACV:** Accidente cerebrovascular

**APC:** alofococianina

**CBA:** Cytometric Bead Array

**CMSP:** células mononucleares de sangre periférica

**CPE:** células progenitoras endoteliales

**DE:** Desviación estandar

**DMF:** Dilatación mediada por flujo

**DO:** Densidad óptica

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**ELISA:** enzimunoensayo

**ET-1:** Endotelina-1

**GIM:** Grosor íntima-media

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**HDL-Col:** Colesterol de alta densidad

**HTA:** Hipertensión arterial

**IAM:** Infarto agudo de miocardio

**IC 95%:** Intervalo de confianza al 95%

**ICC:** Insuficiencia cardíaca congestiva

**ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular

**IFN $\alpha$ :** Interferón alfa

**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-8:** Interleucina-8

**IL-10:** Interleucina-10

**IMC:** Índice de masa corporal

**IQR:** rango intercuartil

**ITB:** Índice tobillo-brazo

**LB:** Linfocito B

**LDL-Col:** Colesterol de baja densidad

**LES:** Lupus eritematoso sistémico

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos

**MFM:** micofenolato de mofetil

**MPO:** Mieloperoxidasa

**OR:** razón de ventajas

**Ox-LDL:** LDL oxidado

**PAD:** presión arterial diastólica

**PAS:** presión arterial sistólica

**PCRs:** Proteína C reactiva de alta sensibilidad

**PE:** ficoeritrina

**RR:** Riesgo relativo

**SLEDAI:** Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

**SLICC/ACR:** Systemic lupus Internacional Collaborating Clinics/ American Collage of Rheumatology Damage Index

**SPECT:** Single Photon Emission Computed Tomography

**TA:** Tensión arterial

**TC:** Tomografía computarizada

**TG:** Triglicéridos

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**VCAM-1:** Molécula de adhesión de la célula vascular

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial

**VOP:** Velocidad de onda de pulso

**VSG:** velocidad de sedimentación globular

## *Índice*

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
1. Pacientes	24
2. Protocolo y diseño	26
2.1 Factores de riesgo cardiovascular clásicos	26
2.2 Factores relacionados con el LES	28
2.3 Marcadores inflamatorios	31
2.4 Tratamientos	31
3. Identificación de la existencia de placa carotídea y cuantificación del grosor íntima-media	33
3.1 Detección de placas ateromatosas	33
3.2 Cálculo del grosor íntima-media	33
4. Medida de la elasticidad arterial mediante velocidad de onda de pulso	35
4.1 Obtención de la señal mediante doppler. Parámetros determinados	36
5. Estudio y cuantificación de células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales y factores solubles en suero	38
5.1 Obtención de las muestras	38
5.2 Determinación de células endoteliales circulantes: estudio de la subpoblación de células apoptóticas	39
5.3 Determinación de las células progenitoras endoteliales circulantes	39
5.4 Estudio de la expresión de factores solubles en el suero de pacientes	41
6. Metodología estadística	44
<b>RESULTADOS</b>	46
1. Resultados generales descriptivos	47
2. Velocidad onda de pulso como medida de arteriosclerosis subclínica	51
2.1 Relación de la VOP con los factores de riesgo clásicos	51
2.2 Relación de la VOP con los factores de riesgo del LES	52
2.3 Relación de la VOP con los tratamientos	54
2.4 Relación de la VOP con las CPE y células endoteliales apoptóticas	55
2.5 Relación de la VOP con los marcadores inflamatorios solubles	58
2.6 Análisis Multivariante	59
3. Grosor íntima-media como medida de arteriosclerosis subclínica	60
3.1 Relación entre el GIM y la VOP	60
3.2 Relación entre el GIM y las células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas	60

---

3.3 Relación entre el grosor íntima-media y marcadores inflamatorios	61
4. Placa carotídea como medida de arteriosclerosis subclínica	62
4.1 Relación entre la existencia de placa y no placa con las células progenitoras endoteliales circulantes y células endoteliales apoptóticas	62
4.2 Relación entre la existencia de placa y no placa con los marcadores inflamatorios solubles	62
5. Relación de las CPE y marcadores inflamatorios solubles	64
5.1 Relación entre las concentraciones de CPE y marcadores inflamatorios solubles con los factores de riesgo cardiovasculares clásicos	64
5.1.1 Comparación de las concentraciones de células progenitoras endoteliales circulantes y marcadores inflamatorios solubles en las pacientes con o sin síndrome metabólico	67
5.2 Relación entre las concentraciones de CPE y marcadores inflamatorios solubles con los factores relacionados con el LES	69
5.3 Relación entre las concentraciones de CPE y marcadores inflamatorios solubles con los diferentes tratamientos	70
<b>DISCUSIÓN</b>	72
<b>CONCLUSIONES</b>	92
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	95

## *Introducción*

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria autoinmune de etiología desconocida que se caracteriza por afectar a cualquier órgano y poder cursar con sucesivas exacerbaciones y remisiones, por la presencia de múltiples autoanticuerpos, en especial anticuerpos antinucleares producidos por una activación policlonal de linfocitos B (LB) y por la presencia de depósitos inmunes viscerales.

El **pronóstico** del LES se ha modificado considerablemente desde los años 50, cuando la esperanza de vida del 50% de los pacientes no superaba los 4 años y el LES era considerado como una enfermedad fatal. A partir de los años 70 se comenzó a conocer que no sólo las complicaciones agudas que producía la enfermedad eran las que condicionaban el pronóstico de estas pacientes, sino las complicaciones a largo plazo, sobre todo el aumento de la incidencia de enfermedad cardiovascular. Urowitz *et al* en un trabajo de 1976, siguieron a 81 pacientes con LES durante 5 años, de los cuales murieron 11 (Urowitz M, 1976). Estos pacientes fallecidos se dividieron en 2 grupos basados en la duración de la enfermedad. El grupo I, integrado por 6 pacientes, que murieron en el primer año desde el diagnóstico y el grupo II, formado por 5 pacientes, que murieron con una media de 8,6 años desde el diagnóstico de LES. Se analizaron las causas de muerte y se observó que los que morían en el primer año tras el diagnóstico de la enfermedad, eran pacientes con lupus activo, daño renal y con elevada incidencia de infecciones. Por el contrario, los que morían tras un curso más largo de la enfermedad, eran pacientes con lupus inactivo y lo hacían, como primera causa, por un infarto agudo de miocardio (IAM). Estos autores describieron por primera vez el fenómeno conocido como “patrón bimodal de mortalidad” del LES. El mismo grupo de Toronto, en posteriores publicaciones, con mayor del número de pacientes, continuó demostrando esta tendencia de muertes tardías cardiovasculares (Rubin LA, 1985; Abu-Shakra M, 1995).



Existe evidencia de este fenómeno en estudios antiguos de **necropsias**. Bulkley *et al* estudiaron la afectación cardíaca en necropsias de 36 pacientes con LES. Se demostró obstrucción significativa de origen arterioesclerótico de las arterias coronarias en el 25% de los pacientes y lo pusieron en relación al tratamiento prolongado con corticoides (Bulkley BH, 1975). Otro estudio analizó 22 necropsias de pacientes con LES y 13 de controles, y evidenció que el número de segmentos enfermos (estenosis coronaria mayor del 50%) era mayor en los pacientes con LES (el 33% de los pacientes presentaban estenosis > 50%) que en los controles (6% de los controles) (Haider YS, 1981).

Hay estudios que proporcionan **evidencia clínica** del aumento de la incidencia de sufrir un evento coronario de los pacientes con LES. Ya el estudio inicial de Urowitz de 1976 cifró esta incidencia en 7,4%. Estudios posteriores de la cohorte de Toronto, estiman un 10% (Abu-Shakra M, 1995) y frecuencias similares se describieron en los grupos de Petri *et al* y de Manzi *et al* en las cohortes de Baltimore y Pittsburgh (Petri M, 1992 a; Manzi S, 1997).

En series más actuales y con mayor número de pacientes (1087) y seguimiento (8,4 años) Urowitz *et al* observaron una incidencia de 10,9% de eventos vasculares de origen arteriosclerótico, siendo este dato muy similar a los previos (Urowitz M, 2007).

Siguiendo con las evidencias clínicas, Manzi *et al* comprobaron que las mujeres con LES entre 35 y 44 años tenían 50 veces más frecuencia de padecer un infarto de miocardio que las mujeres de la misma edad, sexo y semejantes factores de riesgo de la cohorte del estudio Framingham. Estos autores concluyeron que la enfermedad cardiovascular es siete veces más frecuente en LES que en la población general (Manzi S, 1997). De forma similar, un estudio de casos-contróles, mostró que el lupus era un factor de riesgo de infarto de miocardio independientemente de los factores de riesgo clásicos, enfermedad cardiovascular previa e insuficiencia renal (Fisher L, 2004).

Existe un estudio que analiza la morbilidad de los pacientes con LES comparando las causas de hospitalización de cerca de 9000 pacientes con 45000 controles. Los resultados se estratifican por edad y evidencian que el infarto agudo de miocardio es la causa de hospitalización en el 0,52% de los LES entre 18-44 años frente a un 0,23% en el grupo control de la misma edad y sexo. Además, se objetiva que la insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) fue la causa de hospitalización más frecuente en los tres grupos de edad y en el grupo de pacientes entre 18-44 años fue de 3,8 veces más que en el grupo control. Estos mismos pacientes fueron hospitalizados por accidente cerebrovascular (ACV) dos veces más que el grupo control. A la vista de esto, se podría afirmar que la mujeres jóvenes con LES tienen incrementado sustancialmente el riesgo para IAM, ICC y ACV (Ward MM, 1999).

Para evaluar los cambios en el patrón de mortalidad de estos pacientes, existe un estudio de seguimiento a largo plazo (entre 1958 y 2001) de una cohorte internacional de 9547 pacientes en el que se objetiva un incremento de la mortalidad de causa cardiovascular en las últimas 3 décadas a la vez que una disminución de la mortalidad por shock séptico e insuficiencia renal terminal (Bernatsky S, 2006).

A la vista de todos estos datos, cabe plantearse por qué el sistema cardiovascular de los pacientes con LES es tan vulnerable y cual es la relación entre el LES y la arteriosclerosis.

Los estudios preliminares sugerían un aumento en la prevalencia de **factores de riesgo** cardiovascular. Así Petri *et al* estimaron la prevalencia de los factores “clásicos” en una cohorte de 225 pacientes con LES, demostrando que el 53% tenían 3 ó más de los 7 factores de riesgo considerados (Petri M, 1992 b).

Más tarde, se comparó con la prevalencia en controles y se observó una diferencia estadísticamente significativa para la hipertensión, la diabetes e incluso para

la media de factores de riesgo por persona, que en los pacientes con LES era de  $1,01 \pm 1,0$  frente a  $0,72 \pm 1,0$  de los controles ( $p=0,001$ ) (Bruce IN, 2003 a).

Existen dos estudios que comparan la prevalencia de los factores de riesgo en pacientes con lupus y enfermedad coronaria y en pacientes con lupus pero sin evidencia de afectación coronaria. Uno de ellos, citado con anterioridad, es el de Manzi *et al* y compara los factores de riesgo tradicionales entre mujeres con LES con y sin eventos cardiovasculares, encontrando diferencias significativas en la presencia de hipercolesterolemia. Del mismo modo, Petri *et al*, en un segundo estudio con 229 pacientes, encontraron diferencias en algunos de los factores de riesgo, entre los grupos con y sin enfermedad coronaria (Petri M, 1992 b).

Estos estudios sugieren que los pacientes con LES tienen más factores de riesgo que la población general y en consecuencia, más enfermedad coronaria, aunque se ha demostrado que estos factores de riesgo por sí solos, no explican el gran incremento de incidencia de eventos vasculares. Esdaile *et al* reclutaron 263 pacientes de los cuáles 34 habían tenido enfermedad coronaria y 16 habían sufrido un ictus durante un seguimiento medio de 8,6 años. Tras el ajuste pertinente a los factores de riesgo del modelo Framingham, se demostró que la presencia de LES aumenta el riesgo cardiovascular (riesgo relativo (RR) 7,5) y de ictus (RR 7,9), lo cual indica que el LES por sí mismo constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad isquémica coronaria (Esdaile JM, 2001).

Rahman *et al* compararon pacientes con LES que ya habían sufrido un evento coronario con pacientes sin LES con enfermedad coronaria y analizaron los factores de riesgo. Tanto en el grupo de hombres como en el de mujeres el número de factores de riesgo era menor en los pacientes con LES que en los pacientes sin LES (Rahman P, 1999). Esto demuestra que los pacientes con LES necesitan menos factores de riesgo de los llamados clásicos para desarrollar enfermedad coronaria, por lo que debe existir una actividad aterogénica dada por la propia enfermedad.

Dada la elevada incidencia de enfermedad coronaria y relevancia pronóstica de la misma en pacientes con LES, parece justificado la identificación precoz de **ateromatosis subclínica** a distintos niveles, preferiblemente con técnicas no invasivas y de fácil aplicación en la práctica diaria.

Una de estas pruebas no invasivas es **el índice tobillo-brazo (ITB)** que se calcula mediante la relación entre la presión arterial sistólica medida en el tobillo y la presión arterial sistólica (PAS) medida en el brazo. En una persona sana esta relación es  $\geq 1$ . Se trata de un método reproducible con una alta sensibilidad y especificidad para detectar enfermedad arterial periférica. Varios estudios sugieren que podría ser un predictor de arteriosclerosis coronaria y eventos cardiovasculares y una herramienta útil para la detección precoz de arteriosclerosis (Papamichael CM, 2000). En el estudio de Theodoridou *et al* midieron el ITB en 91 pacientes con LES con una media de edad de 39 años y demostraron que a pesar de tratarse de pacientes jóvenes tenían una prevalencia de ITB patológico del 37%, lo que sugiere patología vascular asintomática (Theodoridou A, 2003).

Existen diversos estudios que han valorado la existencia de **placa carotídea**. Roman *et al* compararon la prevalencia de placa carotídea (mediante ecografía modo-B) en una cohorte de mujeres con LES y un grupo control ajustado por edad, sexo, raza y presión arterial. Los pacientes con LES tenían una prevalencia significativamente más alta de placa carotídea en todos los grupos de edad respecto a los controles (Roman M, 2003). Hallazgos similares se encontraron en el estudio de Ahmad *et al* con 200 mujeres con LES y 100 controles (Ahmad Y, 2004) y en la cohorte de Pittsburg de Manzi *et al* en la que determinaron la prevalencia de placa carotídea en 175 mujeres con LES (Manzi S, 1999). Todos estos estudios intentan

correlacionar los hallazgos ecográficos con factores de riesgo clásicos, hallándose resultados estadísticamente significativos con algunos de ellos.

Cuatro años más tarde, el mismo grupo de Roman *et al*, estudió la existencia de placa carotídea en 159 pacientes y analizó la existencia de nuevas placas o la progresión de las mismas en un seguimiento ecográfico de 3 años. Los resultados mostraron una tasa de progresión de 10% por año, dato que es más alto que 5% de los individuos controles. En este estudio, también intentaron correlacionar la existencia de placa y la progresión de la misma con diversas variables para intentar encontrar factores predictores de progresión de la arteriosclerosis y encontraron significación estadística con la edad al diagnóstico de LES, la duración de la enfermedad y los niveles de homocisteína (Roman M, 2007).

El **depósito de calcio en las arterias coronarias** es un marcador de arteriosclerosis. Asanuma *et al* estudiaron la presencia de calcificación coronaria por medio de tomografía computarizada (TC) como medida de arteriosclerosis subclínica en 65 pacientes con LES, comparados con 69 controles. Los autores concluyeron que la calcificación coronaria y por tanto, la arteriosclerosis asintomática, era más frecuente en pacientes con LES. Comparando los pacientes lúpicos con y sin calcificación coronaria, concluyeron que no había diferencias en cuanto a factores de riesgo cardiovascular o reactantes de fase aguda por lo que este aumento de riesgo de arteriosclerosis no puede ser medido por marcadores tradicionales de riesgo cardiovascular y sugieren que el lupus debería ser añadido a la lista de condiciones que aumentan el riesgo de padecer un evento cardiovascular (Asanuma Y, 2003).

El grupo de Baltimore realizó un estudio en 200 pacientes para ver calcificación coronaria mediante TC y encontraron una prevalencia de 43% y relación con la edad, con factores de riesgo convencionales y marcadores inflamatorios (Kiani A, 2008).

Un reciente estudio chino utilizó un TC multicorte para evaluar los depósitos de calcio en las arterias coronarias, carótidas y en la aorta en 50 pacientes con LES

comparadas con controles. Comprobaron que los pacientes con LES tenían más prevalencia y extensión de calcificación arterial en todos los lechos vasculares, sobre todo en el árbol coronario, comparadas con los controles (Yiu KH, 2009).

El grupo de Toronto estudió la **perfusión miocárdica mediante SPECT** (Single Photon Emission Computed Tomography) en 130 pacientes y concluyeron que el 40% de las pacientes tenían algún defecto de la perfusión miocárdica, sugiriendo una alta prevalencia de enfermedad coronaria asintomática (Bruce IN, 2000). Este mismo grupo, siguió a estas pacientes una media de 8,7 años para comprobar si había nuevos eventos coronarios y de 46 pacientes que habían tenían un defecto de perfusión, aparecieron 15 eventos coronarios, sugiriendo que los defectos de perfusión miocárdicos podrían ser un predictor de enfermedad coronaria (Nikpour M, 2009).

Sella *et al* realizaron SPECT miocárdicos con  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi en reposo y tras estrés inducido con dipiridamol en 90 pacientes con LES sin síntomas de enfermedad coronaria y hallaron un 28% de pacientes con defectos de perfusión (Sella E, 2003 a).

En un segundo estudio de Sella *et al*, se realizó **arteriografía coronaria** a 21 de los pacientes con defectos de perfusión en la prueba con isótopos (Sella E, 2003 b). Se identificaron estenosis significativas en sólo el 38% de los pacientes lo que contrasta con lo expuesto anteriormente sobre que el SPECT pudiera ser un buen predictor de enfermedad coronaria.

Se piensa que el endotelio juega un papel importante en la patogénesis de la arteriosclerosis subclínica (Ross R, 1999). Varias técnicas que valoran la **función endotelial** han sido validadas en la población general, todas midiendo repuesta de la célula endotelial a estímulos farmacológicos o fisiológicos. Una de ellas, es la que mide la vasodilatación endotelial mediada por óxido nítrico en respuesta a la isquemia inducida al hinchar un manguito de presión.

Lima *et al* compararon la función endotelial en 69 mujeres con LES comparadas con 35 controles. La dilatación mediada por flujo (DMF) fue significativamente menor en los LES que en los controles, sin embargo en la dilatación tras estímulo con nitratos, que es independiente del endotelio, no hubo diferencias entre los dos grupos (Lima DS, 2002). En otro trabajo, El-Magadmi *et al* describieron los mismos resultados y encontraron correlación negativa con el grosor íntima-media (El-Magadmi M, 2004). En otro estudio reciente, un grupo de Málaga, realizó el mismo estudio pero lo comparó con un grupo control de la misma edad y sexo. Los pacientes con LES tenían peor función endotelial que los pacientes controles (Valdivielso P, 2008).

El **grosor íntima-media (GIM)** en arteria carótida común mediante ecografía doppler ha sido aceptado como marcador precoz de arteriosclerosis subclínica (Poredos P, 2004) y parece estar asociado a incremento de riesgo de infarto de miocardio e ictus (O'Leary DH, 1999). En los pacientes con LES el papel del GIM ha sido más debatido. Varios trabajos han comparado las medidas de GIM en paciente con LES y en controles de características similares. Sólo algunos de estos trabajos obtienen diferencias significativas (Colombo BM, 2007; Shang Q, 2008; Cacciapaglia F, 2009; De Leeuw K, 2009; Valdivielso P, 2008).

De Leeuw *et al* incluyeron a 74 pacientes con LES y 74 controles a quienes les determinaron el GIM y a 52 pacientes se lo repitieron tras un seguimiento de  $32 \pm 7$  meses para observar su progresión. Encontraron que el GIM era mayor en pacientes con LES y que aumentaba con la edad y con la mayor duración de la enfermedad.

En el trabajo de Cacciapaglia *et al* estudiaron el GIM de 33 pacientes con LES y 33 controles de la misma edad, sexo y con los mismos factores tradicionales de riesgo cardiovascular. Observaron que GIM era mayor en pacientes con LES por lo que propusieron que este último parámetro sea utilizado para detectar estadios tempranos de arteriosclerosis subclínica.

La **velocidad de onda de pulso (VOP)** mide elasticidad arterial, lo cual es importante porque alteraciones de la elasticidad arterial pueden traducir de forma precoz cambios que predispongan al desarrollo de patología vascular.

El grupo de Pittsburgh fue uno de los primeros en realizar un trabajo que evaluaba los factores de riesgo asociados con la pérdida de elasticidad arterial medida por la VOP en 220 mujeres con LES (Selzer F, 2001). Posteriormente, este mismo grupo, en 214 mujeres con LES concluyó que la rigidez arterial estaba asociada con la edad, la presión arterial sistólica, enfermedad renal y otros marcadores de actividad lúpica (niveles elevados de C3, leucopenia, hiperinsulinemia) (Selzer F, 2004). Tso *et al* realizaron un estudio similar en 83 pacientes cuyo objetivo era identificar la relación entre la VOP y los factores cardiovasculares (Tso TK, 2005) y Shang *et al* evaluaron la relación entre la elasticidad arterial, la actividad de la enfermedad y el daño orgánico producido por el LES en 32 pacientes comparadas con 32 controles (Shang Q, 2008). En ambos estudios, las pacientes tenían incrementada la VOP en comparación con los controles y se correlacionaba con el índice de actividad del LES (SLEDAI) y con el índice de daño orgánico (SLICC/ACR).

Cacciapaglia *et al* también estudiaron la rigidez arterial midiendo la tensión vascular, la distensibilidad vascular, la elasticidad arterial y el módulo de elasticidad (pressure-strain elastic modulus) en 33 LES comparadas con 33 controles y concluyeron que los pacientes con LES tenían alterados todos estos parámetros en comparación con los controles (Cacciapaglia F, 2009).

En un reciente trabajo español, se diseñó un estudio para comprobar la relación entre síndrome metabólico y velocidad onda pulso en pacientes con LES como marcadores subrogados de arteriosclerosis subclínica. Concluyeron que los pacientes con LES y síndrome metabólico tenían mayor VOP comparados con aquellos sin síndrome metabólico, lo que sugiere que el síndrome metabólico debe contribuir al desarrollo de arteriosclerosis acelerada en LES (Sabio JM, 2009).



Parece claro que en el LES existe un aumento de riesgo de arteriosclerosis y aunque existen estudios que han demostrado un incremento en la prevalencia de factores de riesgo clásicos en estos pacientes, otros sugieren que el incremento del riesgo no es sólo atribuible a éstos y que existe un **factor adicional que es la propia enfermedad y los factores relacionados con ella.**

Así, el tiempo de evolución de la enfermedad y una alta puntuación en las escalas de daño orgánico han sido asociadas con enfermedad cardiovascular precoz independientemente de los factores de riesgo tradicionales. Por ejemplo, en el trabajo de Roman *et al*, se relacionó de forma negativa la presencia de placa carotídea y el uso de terapia intensiva para el LES. Este hallazgo podría deberse a que una terapia más agresiva disminuye los mecanismos de inflamación relacionados con el desarrollo de arteriosclerosis (Roman M, 2003). Hay otros trabajos importantes en los que también se relaciona un índice SLICC/ACR alto con la presencia de estenosis coronaria en angiografía (Sella E, 2003) y con incremento en el GIM (Manzi S, 1999).

En el trabajo de Maksimowickz *et al*, de la cohorte de Pittsburg también observaron un aumento de incidencia de placa carotídea no explicado por los factores de riesgo convencionales (Maksimowickz-Mc Kinnon K, 2006). En el análisis multivariante identificaron la edad, la PAS, los niveles de C3 elevado y una puntuación >3 en el índice de daño orgánico como factores independientes para el desarrollo de arteriosclerosis. Con estos datos, plantean que quizá los pacientes que desarrollan arteriosclerosis no son los que tienen un lupus más activo y que aunque esta observación pueda resultar paradójica, otros estudios en población general han identificado también niveles de C3 como factor de riesgo independiente de IAM en hombres sin eventos isquémicos previos (Muscari A, 1995). Existen otros estudios en pacientes con LES que han obtenido resultados similares y han relacionado el

aumento de C3 con aumento de la velocidad onda-pulso (Selzer F, 2001) y con la rigidez arterial (Selzer F, 2004; Shang Q, 2008).

En el estudio del grupo de Toronto con una población de estudio total de 1087 pacientes con LES, comparando 118 que habían sufrido un evento isquémico con 118 controles, identificaron como factores de riesgo relacionados con el LES, la presencia de vasculitis y de afectación neuropsiquiátrica (Urowitz M, 2007 b).

La enfermedad renal y el desarrollo de nefritis lúpica han sido asociadas con hipertensión e incremento del riesgo de arterioesclerosis. Muchos estudios han encontrado que la proteinuria mantenida está asociada al desarrollo de arteriosclerosis subclínica en el LES (Theodoridou A, 2003; Manger K, 2003). La creatinina ha sido identificada como factor de riesgo en el análisis univariable del trabajo de Maksimowicz-Mc Kinnon *et al*, y en un estudio posterior como predictor independiente de progresión del GIM en pacientes con LES, sugiriendo que el daño renal contribuye o es un marcador de progresión de enfermedad cardiovascular (Thompson T, 2008).

Un factor importante a tener en cuenta en el desarrollo de arteriosclerosis en el LES es la relación con el tratamiento. El papel de los corticoides en el desarrollo de arteriosclerosis es controvertido. Por un lado, existen estudios que relacionan el tratamiento con corticoides con mayor arteriosclerosis, como por ejemplo el estudio clásico de Bulkley *et al* y otros más recientes como el de Bessant *et al*, basándose en que la terapia con esteroides empeora los factores de riesgo clásicos, aumentando la incidencia de hipertensión, diabetes y empeorando el perfil lipídico. Sin embargo, existen estudios que observaron que una terapia intensiva mejora los mecanismos de inflamación del LES que también están implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis (Roman M, 2003). La mayoría de estos estudios tienen como limitación

fundamental que no están ajustados por la actividad de la enfermedad. Existe un trabajo reciente en el que después de un complejo análisis estadístico observaron que dosis altas de corticoides estaban asociadas a un aumento significativo de los factores de riesgo después de ajustar por la actividad y duración de la enfermedad. Los resultados que obtuvieron fueron que con cada aumento de 10 mg en la dosis diaria de prednisona, aumenta un 16% el riesgo estimado de enfermedad cardiovascular (ECV) en los 2 años siguientes, mientras que por cada 6 puntos que aumenta el SLEDAI, aumenta un 5% el riesgo. El estudio concluye afirmando que tanto la terapia con corticoides como la actividad del LES juegan un papel importante en el desarrollo de la ECV (Karp I, 2008).

Después de todo lo anterior podemos afirmar que el LES y la arteriosclerosis están íntimamente unidos y ello se puede explicar porque comparten mecanismos etiopatogénicos comunes. Por muchos años, el desarrollo de arteriosclerosis en la población general se ha considerado como una acumulación pasiva de lípidos en la pared de las arterias, sin embargo, actualmente se conoce que la inflamación juega un papel, no sólo en el desarrollo de la lesión arteriosclerótica sino también en la rotura de las placas que ocurre en los cuadros isquémicos agudos. Existe pues, evidencia de que en la génesis de la arteriosclerosis interactúan mecanismos inmunológicos y factores de riesgo metabólicos que inician, propagan y activan las lesiones del árbol arterial.

## **El papel de la inflamación en la génesis de la arteriosclerosis. Formación de la placa**

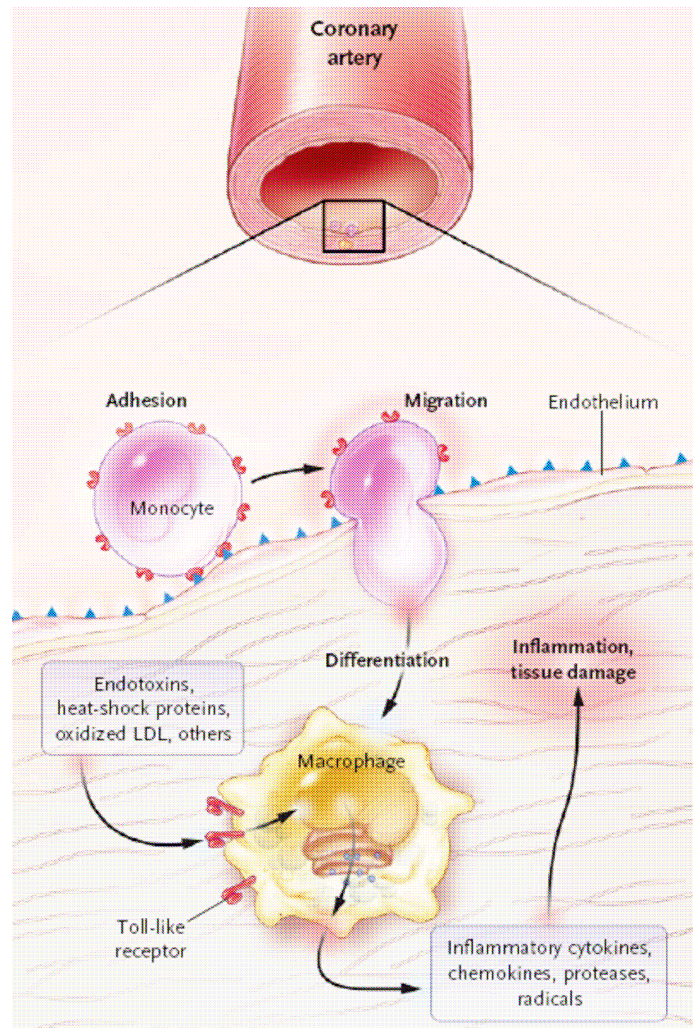
La lesión arteriosclerótica comienza con el paso de moléculas de LDL-col a la íntima arterial lo que provoca una respuesta inflamatoria en la pared de las arterias. Las moléculas de LDL-col en el interior de la pared arterial, se unen a la matriz extracelular del espacio subendotelial. Aquí mediante una reacción oxidativa se convierten en una molécula proinflamatoria, el LDL oxidado (Ox-LDL) y las células endoteliales en presencia de este Ox-LDL producen citocinas y moléculas de adhesión. Las citocinas producidas por las células endoteliales promueven la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Las moléculas de Ox-LDL son fagocitadas por macrófagos que se convierten en células espumosas que son la base de la placa arteriosclerótica. Niveles elevados de Ox-LDL están asociados a enfermedad coronaria en la población general y también están descritos en pacientes con LES, especialmente en aquellos con historia de enfermedad cardiovascular (Mc Mahon M, 2007). A su vez, muchas moléculas y partículas como endotoxinas bacterianas o fragmentos de células apoptóticas y el mismo Ox-LDL son reconocidos por los receptores de los macrófagos (Toll-like receptor) induciendo activación y perpetuando la formación de citocinas inflamatorias, radicales libres y otras moléculas pro-inflamatorias que inducen la inflamación y el daño en el tejido.

Las moléculas de adhesión, como la selectina-E, la molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) son proteínas de la superficie celular y se expresan en los periodos de inflamación, inducidas por la presencia de citocinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1). La importancia de estas moléculas de adhesión en el desarrollo de la arteriosclerosis está apoyada en el hecho de que en estudios con ratones deficientes en apo-E y con deficiencia también de selectina-E,

desarrollan menos placas ateroscleróticas. También en que niveles de VCAM-1 pueden ser detectados en la circulación sistémica en pacientes con enfermedad coronaria (Mehra VC, 2005).

Mediante las moléculas de adhesión, los leucocitos se adhieren a la superficie de las células endoteliales y migran a través del endotelio al interior de la íntima. Esta migración está influida por proteínas quimiotácticas como por ejemplo, la MCP-1 producidas por el endotelio y las células del músculo liso. La expresión de la MCP-1 está también regulada por el TNF $\alpha$ , IL-1 y por el Ox-LDL. Por el contrario, la expresión de MCP-1 está inhibida por el HDL-col, lo que podría explicar en parte los efectos beneficiosos de niveles altos de HDL-col endógeno. La importancia del MCP-1 en el desarrollo de la placa de arteriosclerosis se ha puesto en evidencia por estudios que han observado que niveles de MCP-1 elevados están relacionados positivamente con aumento del GIM. La mayoría de los leucocitos que pasan al interior son linfocitos T que producen citocinas Th1 (IFN $\alpha$ ), las cuales activan a los macrófagos y a las células endoteliales, perpetuando la inflamación (Hansson GK, 2005).

Por último, los monocitos y las células T infiltran el margen de la placa formado por las células espumosas y las células musculares de la capa media arterial se estimulan y crecen. Estas células musculares ocupan parte de la luz del vaso, provocando fibrosis. La rotura de una de estas placas y la agregación de las plaquetas es lo que provoca la obstrucción del vaso y el evento isquémico agudo (McMahon M, 2007).



**Figura 1:** En este esquema se muestra la entrada del monocito en la pared vascular lo que induce la formación de citocinas inflamatorias que provocan la inflamación del tejido. (Hansson GK, 2005)

A la vista de todo lo anterior, podemos concluir que la arteriosclerosis es un proceso inflamatorio complejo que se caracteriza por la interacción de componentes de la inmunidad innata y adquirida. El incremento del riesgo de arteriosclerosis en el LES se debe probablemente, a la interrelación de muchos de esos mediadores inmunológicos e inflamatorios que intervienen en las dos entidades, o dicho de otro modo, arteriosclerosis y lupus “comparten” mediadores inflamatorios fundamentales en su etiopatogénesis. Entre los que se han descrito, destaca el factor de necrosis

tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Skoog T, 2002), la interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Inoue M, 1998), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) (Hwang SJ, 1997), la selectina-E (Hwang SJ, 1997) y la mieloperoxidasa (MPO) (Zhang R, 2001).

Teniendo en cuenta que en el LES la arteriosclerosis está presente de forma prematura, existen estudios que analizan las concentraciones de estos marcadores de inflamación en estos pacientes comparándola con controles sanos y poniéndola en relación con métodos de detección de arteriosclerosis. Asanuma *et al* analizaron la concentración de IL-6, IL-8 y MCP-1 en 74 pacientes con LES y 85 controles, sometidos a un TAC coronario. Tras los análisis, se concluyó que los pacientes con LES tenían concentraciones más elevadas de IL-6 y MCP-1 y que la IL-6 estaba asociada a calcificación coronaria (Asanuma Y, 2006). Kuryliszyn-Moskal *et al* analizaron la concentración de endotelina-1, E-selectina y la trombomodulina en 76 pacientes con LES y 34 controles sanos. Encontraron niveles más altos de estos marcadores en los pacientes en relación a los controles y relacionaron niveles de endotelina-1 más altos con mayor actividad de la enfermedad (Kuryliszyn-Moskal A, 2008).

En el trabajo de Colombo *et al*, se comparan los niveles de VEGF y el GIM en 80 pacientes con LES y 80 controles. Las pacientes tenían un GIM mayor y unos niveles mayores de VEGF (Colombo BM, 2009). Rho *et al*, hacen una comparación de los niveles de distintas citocinas, moléculas de adhesión, reactantes de fase aguda y enzimas inflamatorias en 109 LES y 78 controles y lo relacionan con la existencia de placas calcificadas en TC coronario. Concluyeron que la mayoría de los marcadores estaban aumentados en los LES y que la E-selectina, VCAM-1, ICAM-1 y TNF $\alpha$  estaban asociadas con la gravedad de los hallazgos en el TC (Rho YH, 2008). Este mismo grupo y con los mismos pacientes analiza los niveles de distintas adipocitocinas, también relacionadas con el desarrollo de arteriosclerosis.

Comprobaron que en los pacientes con LES los niveles de algunas adipocitocinas estaban aumentados, pero no pudieron relacionarlo con los hallazgos de calcificación coronaria en el TC (Chung CP, 2009).

Posteriormente se comenzó a estudiar la fisiología del endotelio y su funcionamiento para comprender mejor el inicio del daño vascular y hay estudios que han confirmado que la disfunción endotelial tiene significación pronóstica en cuanto al riesgo de desarrollo de arteriosclerosis (Schachinger V, 2000). En 2004 se comenzó a valorar el papel del daño y la apoptosis de las células endoteliales en el desarrollo de disfunción vascular en el LES (Rajogopalan S, 2004). Según estos estudios, el LES está asociado con una función endotelial alterada y un aumento de la apoptosis celular, esto provocaría una disminución en la producción de óxido nítrico que facilitaría la agregación plaquetaria y potenciaría la aterogénesis (Freedman JE, 1998).

Un aspecto de crucial importancia para preservar la integridad del endotelio y prevenir la formación de la placa tras un daño vascular (apoptosis) es el mantenimiento de una reparación vascular normal. La reparación vascular está mediada principalmente por las células progenitoras endoteliales (CPE) derivadas de médula ósea, que comparten características tanto de células *stem* hematopoyéticas como de células endoteliales. En respuesta a señales de estímulo indicativas de daño vascular, las CPE son capaces de migrar a sangre periférica, proliferar y diferenciarse a células endoteliales maduras. Los individuos con disminución de CPE circulantes tienen mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que los individuos con números normales de CPE (Werner N, 2005). Los pacientes con factores de riesgo cardiovascular o con enfermedades caracterizadas por una arteriosclerosis prematura muestran una reparación vascular aberrante, niveles disminuidos y una funcionalidad anómala de las CPE (Grisar J, 2005). Existen algunos estudios que cuantifican éstos progenitores en pacientes con LES como marcador de daño endotelial (Robak E,



2009; Grisar J, 2008) y otros que lo han intentado correlacionar con el grado de actividad de la enfermedad (Elshal M, 2009) y con el desarrollo prematuro de arteriosclerosis (Westerweel PE, 2007). En pacientes con LES, recientemente se ha descrito una reducción del número de células progenitoras endoteliales circulantes que además presentan una funcionalidad alterada (Moonen JR, 2007), incluso en pacientes en remisión clínica (Westerweel PE, 2007).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, parece necesario realizar estudios que aclaren el papel de las CPE en el daño vascular, buscando una asociación entre su concentración y la medida de la arteriosclerosis subclínica por alguno de los métodos validados por estudios previos. Así se podrá determinar si las CPE constituyen un nuevo marcador de daño vascular prematuro en pacientes con LES.

## Objetivos

El LES está asociado a una mayor prevalencia de daño vascular subclínico, arteriosclerosis y cardiopatía isquémica.

La explicación de este incremento en la frecuencia de arteriosclerosis no está clara y aunque el papel de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos y la propia actividad lúpica puede ser importante, estos no son capaces de explicar el fenómeno por completo, por lo que se investiga si un aumento en los marcadores inflamatorios, un aumento en la apoptosis de células endoteliales o un defecto en el número y función de los progenitores de las células endoteliales pudieran estar implicados.

Encontrar nuevos procedimientos que faciliten detectar la lesión arterial antes de que se manifieste clínicamente, ha sido esencial. De ellos, la medida de la VOP es un procedimiento muy sensible y altamente reproducible a la hora de determinar la lesión endotelial precoz.

El objetivo principal de este trabajo de investigación realizado en población lúpica, ha sido la búsqueda de nuevos marcadores biológicos para el diagnóstico de arteriosclerosis subclínica en el LES. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Valorar la relación entre la cantidad de CPE, células apoptóticas endoteliales y marcadores inflamatorios con la pérdida de la elasticidad arterial medida por la VOP.

2. Analizar los factores de riesgo cardiovasculares clásicos, los relacionados con el LES y los tratamientos de pacientes con LES y su relación con el incremento de la rigidez arterial medido por la VOP.

3. Valorar la relación entre la cantidad de CPE, células apoptóticas endoteliales y marcadores inflamatorios con la existencia de placa carotídea y de aumento del grosor íntima-media.

4. Analizar la relación entre los factores de riesgo clásicos, los relacionados con el LES y los tratamientos con la concentración de CPE, células apoptóticas endoteliales y marcadores inflamatorios.

## *Materiales y Métodos*

## 1. Pacientes

Se incluyeron en el estudio 46 pacientes diagnosticados de LES, todas eran mujeres, con una mediana de edad de 48 años (rango 19-64), procedentes de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda. La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico fue de 11 años (rango 1-35). Todas las pacientes cumplían cuatro o más criterios del American College of Rheumatology (ACR) para el diagnóstico de LES (tabla 1). Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del hospital.

**Tabla 1. Criterios diagnósticos de la ACR para la clasificación de LES.**

<b>Criterio</b>	<b>Definición</b>
1. Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, tendiendo a expandirse a los pliegues nasolabiales.
2. Eritema discoide	Placas elevadas eritematosas con descamación queratósica adherente y taponamiento folicular. Pueden quedar cicatrices atróficas en lesiones antiguas.
3. Fotosensibilidad	Eritema en la piel como resultado de una reacción inusual a la luz solar.
4. Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, normalmente sin dolor, observada por un especialista.
5. Artritis	Artritis no erosiva afectando a 2 o más articulaciones periféricas, caracterizadas por dolor, tumefacción o derrame.
6. Serositis	a) pleuritis: historia convincente de dolor pleurítico o roce oído por un especialista; o evidencia de derrame pleural. b) pericarditis: documentada por electrocardiograma, roce o evidencia de derrame pericárdico.
7. Alteración renal	a) proteinuria persistente >0,5gr/día ó >3+ si no se cuantifica. b) cilindros celulares: deben ser células rojas, hemoglobina. Pueden ser granulares, tubulares o mixtos.
8. Alteración neurológica	a) convulsiones.

	b) psicosis. Ambos en ausencia de drogas o alteraciones metabólicas conocidas como uremia, cetoacidosis o alteraciones de electrolitos.
9. Alteración hematológica	a) anemia hemolítica con reticulocitosis. b) leucopenia <4.000/mL en 2 ó más ocasiones. c) linfopenia <1.500/mL en 2 ó más ocasiones. d) trombopenia <100.000/mL en ausencia de drogas.
10. Alteración inmunológica	a) célula LE positiva. b) anticuerpos anti-DNA nativo con un título anormal. c) anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm. d) test falso positivo para sífilis, siendo positivo durante al menos seis meses y confirmado por inmovilización de <i>treponema pallidum</i> o test de absorción con anticuerpo treponémico fluorescente.
11. Anticuerpos antinucleares	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o una técnica equivalente, en cualquier momento y en ausencia de drogas asociadas a "lupus inducido por drogas".

---

## **2. Protocolo y diseño**

Se trata de un estudio trasversal que durante 5 meses (Diciembre 09-Abril 10) reclutó pacientes que acudían a consultas para una revisión rutinaria.

A todas las participantes se les realizó una historia clínica y una exploración física completa que incluía peso, talla, índice de masa corporal (IMC), circunferencia abdominal, tensión arterial (TA) y frecuencia cardíaca. Para la medida de TA, se empleó esfigmomanómetro manual y se realizaban 2 tomas, una al principio de la consulta y otra al final, obteniéndose después la media de las dos tomas.

Se les extrajo una analítica de sangre para la determinación de parámetros bioquímicos e inmunológicos tras un ayuno de al menos 8 horas, utilizando las técnicas habituales. Los análisis se realizaban en el laboratorio del Servicio de Bioquímica e Inmunología de nuestro hospital.

Se obtuvieron además otros parámetros demográficos y clínicos de la revisión de las historias clínicas y con todo ello se diseñó una base de datos.

### **2.1 Factores de riesgo cardiovascular clásicos**

En la analítica de sangre extraída se incluía la determinación de glucosa (valores normales según nuestro laboratorio: 60-100 mg/dl), hemoglobina glicosilada (4,5-6,3%), colesterol total (150-200 mg/dl), colesterol LDL (70-160 mg/dl), colesterol HDL (45-90 mg/dl), triglicéridos (30-200 mg/dl), ácido úrico (2,5-6 mg/dl), creatinina (0,5-0,9 mg/dl), urea (21-50 mg/dl), cociente microalbúmina/creatinina (30-299 mg/g).

A los pacientes se les preguntó por su hábito tabáquico y se clasificaron en no fumadoras (nunca fumadoras o exfumadoras  $\geq$  6 meses) y fumadoras (independientemente del número de cigarrillos).



Se definió hipertensión arterial (HTA) cuando la TA sistólica (TAS)  $\geq 140$  mmHg o TA diastólica (TAD)  $\geq 90$  mmHg o la paciente estuviera en tratamiento con antihipertensivos. Se consideró diabetes mellitus cuando la paciente estaba bajo tratamiento con antidiabéticos orales o insulina o si la glucemia en ayunas era  $\geq 126$  mg/dl. Glucemia alterada en ayunas se definió como la glucemia en ayunas entre 100-125 mg/dl. Hipercolesterolemia se definió como colesterol total  $\geq 190$  mg/dL o LDL colesterol  $\geq 115$  mg/dL o tratamiento con hipolipemiantes. Hipertrigliceridemia se definió como una cifra de triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL o tratamiento hipolipemiante.

La historia familiar de enfermedad cardiovascular se consideró como presente si la paciente tenía un familiar de primer grado que hubiese sufrido un infarto de miocardio o ictus antes de los 55 años en hombres o 65 años en mujeres.

Se calculó la existencia de síndrome metabólico siguiendo las definiciones usadas por el ATP III (Adult Treatment Panel, 2001). De acuerdo con estas definiciones se consideró como síndrome metabólico presente si los pacientes cumplían 3 o más de los siguientes criterios:

- Circunferencia abdominal mayor 102 cm para hombres y mayor de 88 cm en mujeres.
- TAS mayor o igual a 130 mmHg o TAD mayor o igual a 85 mmHg o toma de medicación antihipertensiva.
- HDL-col menor de 40 mg/dl en hombres y menos de 50 mg/dl en mujeres.
- Triglicéridos (TG) mayor o igual a 150 mg/dl
- Glucosa en ayunas mayor o igual a 110 mg/dl.

También se calculó el HeartScore® que estima el riesgo de muerte cardiovascular a 10 años incluyendo infarto e ictus mortal, basado en la edad, el sexo, el tabaquismo, la presión arterial, el colesterol total en sangre, o la razón colesterol

total/colesterol-HDL. El modelo de cálculo está basado en el proyecto SCORE que incluye más de 200.000 individuos (Conroy RM, 2003). Los modelos nacionales se basan en la colaboración de esa función con las estadísticas locales de mortalidad. Para el cálculo se utilizó la aplicación disponible en la página web: <http://www.heartscore.org/es/>

Se revisaron las historias clínicas de las pacientes en búsqueda de enfermedad cardiovascular previa definida como la presencia de enfermedad coronaria (infarto de miocardio o angina), cerebral (accidente isquémico transitorio o ictus) o arteriopatía periférica.

## 2.2 Factores relacionados con el LES

La media de la duración de la enfermedad era de  $14 \pm 9$  años y 25 pacientes (54,3%) llevaban más de 10 años diagnosticadas de LES. En relación al tipo de afectación del LES, el 2,2% de las pacientes padecía un LES con afectación exclusivamente cutánea y el 6,5% con afectación exclusivamente visceral. La mayoría de las pacientes (91,3%) tenían un LES con afectación mixta.

Para cada uno de los pacientes se valoró el grado de actividad de la enfermedad teniendo en cuenta cada descriptor recogido en el formulario del “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index” (SLEDAI) (tabla 2) (Bombardier C, 1992). Treinta y nueve pacientes presentaban una enfermedad no activa, definida como  $SLEDAI \leq 4$  y siete pacientes se encontraban con un valor de SLEDAI comprendido entre 5 y 8. El daño orgánico se evaluó mediante el “Systemic Lupus Internacional Collaborating Clinics/ American Collage of Rheumatology Damage Index” (SLICC/ACR) que incluye una evaluación de 12 órganos que se detalla en la tabla 3 (Gladman D, 1996). Trece pacientes no tenían daño orgánico (SLICC= 0) y 33 pacientes tenían un SLICC comprendido entre 1 y 6.

**Tabla 2. Formulario del índice de actividad de la enfermedad en LES (SLEDAI)**

Valor	Descriptor	Definición
8	Crisis epiléptica	Episodio reciente. Excluir causas metabólicas, infecciosas o inducidas por fármacos.
8	Psicosis	Incapacidad para la actividad normal por alteración de la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, pérdida marcada de asociación, pensamiento empobrecido o ilógico, comportamiento raro, desorganizado o catatónico. Excluir uremia o inducción por fármacos.
8	Síndrome orgánico cerebral	Función mental alterada con disminución en la orientación, memoria u otras funciones intelectuales, de rápida aparición y características fluctuantes. Incluye aturdimiento de la conciencia con capacidad reducida para la concentración e incapacidad para mantener la atención, más al menos dos de las siguientes características: alteración de la percepción, habla incoherente, insomnio o somnolencia diurna, actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas metabólicas, infecciosas o inducidas por fármacos.
8	Alteración visual	Cambios en la retina. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudado seroso o hemorragias en la coroides o neuritis óptica. Excluir hipertensión, infección o inducción por fármacos.
8	Alteración del nervio craneal	Nueva aparición de neuropatía sensorial o motora, implicando a los pares craneales.
8	Cefalea lúpica	Dolor de cabeza severo y persistente. Puede ser migrañoso, pero no debe responder a analgesia narcótica.
8	ACVA	Nuevo accidente cerebrovascular. Excluir arteriosclerosis.
8	Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos en los dedos, infarto periungueal, hemorragias en astilla o biopsia o angiograma con vasculitis probada.
4	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación (tumefacción o derrame).
4	Miositis	Dolor/debilidad muscular proximal, asociado con elevación de CPK/aldolasa o cambios electromiográficos o biopsia demostrando miositis.
4	Cilindros urinarios	Cilindros celulares hemo-granulares o eritrocitarios.
4	Hematuria	>5 hematíes/campo. Excluir cálculos, infección u otras causas.
4	Proteinuria	> 0,5 g /24h. Nuevo episodio o incremento reciente de > 0,5g/24h
4	Piuria	> 5 leucocitos/campo. Excluir infección.
2	Nuevo eritema	Nuevo episodio o recurrencia de eritema de tipo inflamatorio.
2	Alopecia	Nuevo episodio o recurrencia de pérdida de pelo anormal, en mechones o difuso.
2	Úlceras mucosas	Nuevo episodio o recurrencia de ulceración oral o nasal.
2	Pleuritis	Dolor torácico pleurítico con roce, derrame, o engrosamiento pleural.
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos una de las siguientes características: roce, derrame, o confirmación mediante ECG o ecocardiograma.
2	Complemento bajo	Disminución de CH50, C3 o C4 por debajo del límite inferior normal según el laboratorio.
2	Aumento de unión de ADN	> 25% de unión por el ensayo de Farr, o por encima del rango normal según el laboratorio.
1	Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm <sup>3</sup> .
1	Leucopenia	< 3.000 leucocitos/ mm <sup>3</sup> . Excluir la causada por fármacos.

**Tabla 3. Formulario del índice de daño acumulado en LES (SLICC/ACR)**

Órgano afectado	Valor	Definición
Ocular	1	Cataratas, cambios en la retina o atrofia óptica.
Neuropsiquiátrico	1	Déficit cognitivo (déficit de memoria, dificultad para el cálculo, concentración disminuida, dificultad para hablar o escribir) o psicosis mayor.
	1	Convulsiones necesitando tratamiento al menos 6 meses.
	1(2)	Accidente cerebrovascular (puntuación de 2 si más de 1 episodio).
	1	Neuropatía craneal o periférica (excluyendo óptica).
	1	Mielitis trasversa.
Renal	1	Filtrado glomerular estimado o medido < 50%.
	1	Proteinuria $\geq 3,5$ g/24h.
	3	Enfermedad renal terminal.
Pulmonar	1	Hipertensión pulmonar.
	1	Fibrosis pulmonar (examen físico o radiológico).
	1	Pérdida de volumen pulmonar (radiológico).
	1	Fibrosis pleural (radiológico).
	1	Infarto pulmonar (radiológico).
Cardiovascular	1	Angina o bypass coronario.
	1(2)	Infarto de miocardio (puntuación de 2 si más de 1 episodio).
	1	Miocardiopatía con disfunción ventricular.
	1	Valvulopatías (soplo diastólico o sistólico $>3/6$ ).
	1	Pericarditis con tratamiento > 6 meses o pericardiectomía.
Vascular periférico	1	Claudicación > 6 meses.
	1	Pérdida de tejido menor (ulceración de pulpa de los dedos) por mala circulación periférica.
	1(2)	Pérdida de tejido significativa (pérdida de dedos) por mala circulación periférica.
	1	Trombosis venosa con ulceración, inflamación o estasis venoso.
Gastrointestinal	1	Infarto o resección de parte del intestino, bazo, hígado o vesícula por cualquier causa.
	1	Angina mesentérica.
	1	Peritonitis crónica.
	1	Estenosis esofágica o cirugía del tracto gastrointestinal superior.
Musculoesquelético	1	Debilidad o atrofia muscular.
	1	Artritis erosiva o deformante.
	1	Osteoporosis con fractura o colapso vertebral.
	1(2)	Necrosis avascular (puntuación de 2 si más de 1 articulación).
	1	Osteomielitis.
Piel	1	Alopecia cicatricial.
	1	Cicatrices extensas o paniculitos distintas al cuero cabelludo o pulpa.
	1	Ulceración de la piel (excluyendo trombosis) por más de 6 meses.
Fallo gonadal prematuro	1	
Diabetes	1	O necesidad de tratamiento.
Cáncer	1(2)	Excluyendo displasia (puntuación de 2 si más de 1).

En la analítica extraída a todas las pacientes se incluía un hemograma completo y pruebas inmunológicas relacionadas con el LES, como la velocidad de sedimentación globular (0-25 mm), niveles de C3 (90-180 mg/dl), C4 (10-40 mg/dl), anticuerpos antinucleares (inmunofluorescencia; ANA), anticuerpos anti-DNA (ELISA), anticuerpos anti-ENA (ELISA), anticoagulante lúpico (veneno de víbora de Russell; ratio confirmatorio 0-1,12), anticuerpos anticardiolipina (ELISA; IgM, IgG; positivo si >18 U/ml) y anticuerpos anti- $\beta$ 2glicoproteína 1 (ELISA; IgM, IgG; positivo si >8 U/ml).

### 2.3 Marcadores inflamatorios

Se determinaron varios marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRas) (inmunoturbimetría; 0,1-10 mg/L), homocisteína (nefelometría; 4,6-12,5  $\mu$ mol/L), dímero D (inmunoturbidimetría; 0,1-0,5  $\mu$ g/L), fibrinógeno (método derivativo; 150-450 mg/dl).

### 2.4 Tratamientos

Se registró cualquier tratamiento específico del LES que la paciente hubiese recibido a lo largo de los años de evolución de la enfermedad, así como el tratamiento habitual recibido en los últimos 3 meses, denominándolo tratamiento actual.

Para el estudio se establecieron dos categorías, con y sin tratamiento inmunosupresor, definiendo tratamiento inmunosupresor como la toma habitual de alguno de los siguientes: corticoides, micofenolato de mofetil (MMF), ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida o metotrexate.

Teniendo en cuenta el tratamiento recibido a lo largo del curso de la enfermedad: 41 pacientes habían recibido antimaláricos, 39 habían recibido corticoides, 15 MMF, 5 ciclosporina, 13 azatioprina, 12 ciclofosfamida y 4 metotrexate. Si tenemos en cuenta sólo el tratamiento recibido en los últimos 3 meses: 36 pacientes

recibían antimaláricos, 21 corticoides, 13 MFM, 1 ciclosporina y no había ningún paciente en tratamiento con ciclofosfamida ni con metotrexate.

El análisis de los datos en el estudio, se basó en el siguiente esquema:

Tabla 4. Tratamiento recibido a lo largo del curso de la enfermedad.

	N
Ningún tratamiento	2
Antimaláricos sólo	5
Inmunosupresores sólo	3
• Corticoides sólo	0
• Resto de inmunosupresores	0
• Corticoides + resto de inmunosupresores	3
Antimaláricos + Inmunosupresores	36
• Antimaláricos + corticoides sólo	13
• Antimaláricos + corticoides + resto de inmunosupresores	23
• Antimaláricos + resto inmunosupresores	0
<b>Total</b>	<b>46</b>

Tabla 5. Tratamiento actual.

	N
Ningún tratamiento	8
Antimaláricos sólo	14
Inmunosupresores sólo	2
• Corticoides sólo	1
• Resto de inmunosupresores	1
Antimaláricos + Inmunosupresores	22
• Antimaláricos + corticoides	20
• Antimaláricos + resto de inmunosupresores	2
<b>Total</b>	<b>46</b>

### **3. Identificación de la existencia de placa carotídea y cuantificación del grosor íntima-media (GIM)**

A cada uno de los pacientes se les realizó un estudio ecografico modo B de ambos territorios carotideos cervicales en el Laboratorio de Hemodinámica Cerebral perteneciente al Servicio de Neurología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Para ello se utilizó un ecógrafo Philips modelo IU22 equipado con EcoDoppler Color y cuantificación automática de GIM.

Con el paciente en decúbito supino, se realizó un estudio transversal y longitudinal de la arteria carótida común, bifurcación carotídea, bulbo carotídeo y el segmento proximal de las arterias carótidas externa e interna (los primeros 15 mm), bilateralmente.

#### **3.1 Detección de placas ateromatosas**

Para la determinación de placas, se analizaron diversas imágenes transversales y longitudinales procediendo a la grabación de aquellas en las que se observaba la existencia de placa, tanto en carótida común, bifurcación y arterias carótidas internas y externas. Se consideró placa ateromatosa a aquellos engrosamientos endoteliales localizados de suficiente grosor que protuyera en la luz arterial en cualquier localización de los segmentos estudiados.

#### **3.2 Cálculo del Grosor Intima-Media (GIM)**

En cada sujeto se determinó el GIM en tres diferentes localizaciones de cada arteria carótida común a una distancia de más de 1 cm de la bifurcación, para evitar la existencia de engrosamientos de origen mecánico/turbulento. La cuantificación del

GIM se realizó de forma automática mediante el Software perteneciente al propio equipo diseñado específicamente para el estudio de este marcador vascular.

Para el cálculo del valor medio del GIM, se hicieron las medias matemáticas de las tres determinaciones de cada arteria carótida común y posteriormente se tomó como valor de cada paciente la cifra media entre los valores de ambos lados.

Todas estas determinaciones fueron realizadas por la misma persona en todos los pacientes, y en el mismo día de exploración para cada paciente



#### 4. Medida de la elasticidad arterial mediante velocidad de onda de pulso (VOP).

La elasticidad arterial puede ser medida directamente y de forma no invasiva en varias zonas del árbol arterial. La mayor ventaja de éstas medidas no invasivas es que están basadas en mediciones directas de parámetros fuertemente relacionados con la elasticidad de la pared como es la velocidad de propagación de la onda de presión originada en la aorta proximal por la eyección del ventrículo izquierdo.

La aorta es el mejor vaso cuando queremos determinar la elasticidad arterial por al menos dos razones:

- La aorta torácica y abdominal tienen la mayor contribución a la propagación de la onda de presión.
- La VOP aórtica es un predictor independiente de eventos vasculares en una variedad amplia de población (Laurent S, 2003).

La medida de la VOP aórtica o en el segmento carótido-femoral (desde la carótida común en región supraclavicular a la arteria femoral en el pliegue inguinal) es aceptada de forma general como el método más simple, no invasivo y reproducible para determinar la elasticidad arterial por su relación matemática con el Módulo de Elasticidad arterial según la **Fórmula de Korteweg**:

$$VOP = \sqrt{(E * e / D * \rho)}$$

Donde: **VOP** en cm/s

**E** es el módulo de elasticidad (Módulo de Young) en dinas/cm<sup>2</sup>

**e** es el espesor de la arteria.

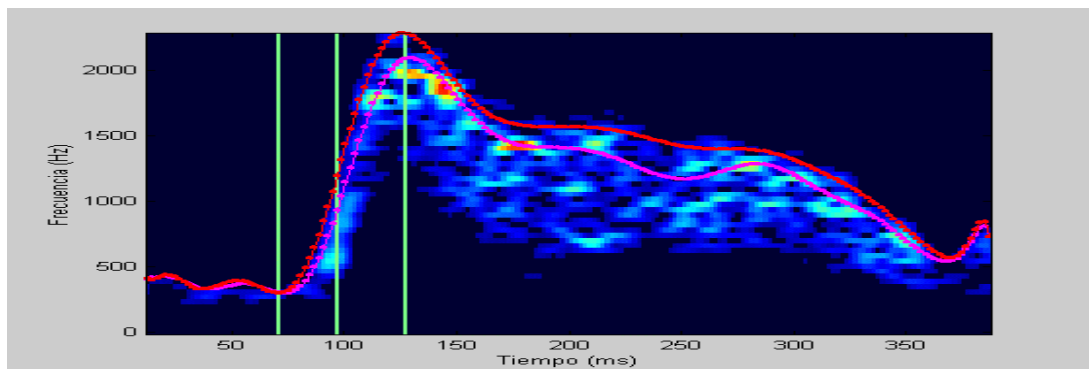
**D** es el diámetro interior.

**ρ** es la masa específica del fluido (1,05 para la sangre).

La VOP carótido-femoral ha sido usada en estudios epidemiológicos demostrando el valor predictivo de la elasticidad aórtica para eventos cardiovasculares por lo que se considera el “gold standard” para la medida de la elasticidad arterial.

#### 4.1 Obtención de la señal mediante doppler. Parámetros determinados

Para el cálculo de la VOP, se dispuso de un prototipo de Software de análisis morfo-temporal (Jiménez C, 2003) para análisis de onda con Velocimetría Doppler, que nos permite conocer el tiempo de llegada en cualquier punto arterial del pie de la onda de velocidad Doppler a partir de la onda R del electrocardiograma (EKG). De este modo, mediante la resta de ambos tiempos, se calcula la diferencia en tiempos que tarda la onda de presión en recorrer el segmento arterial comprendido entre los puntos carotídeo y femoral determinados. Los valores se promediaron de 15 señales consecutivas en cada toma (Figura 2).



**Figura 2:** Registro representativo de la onda de velocidad doppler en una paciente.

La distancia entre los puntos de muestreo carotídeo y femoral se determina mediante cinta métrica desde el manubrio esternal hasta la cicatriz umbilical, sumándole la distancia entre este último punto y el punto de determinación de la señal en la femoral en el pliegue inguinal.

Una vez calculada la diferencia de tiempo de tránsito de la onda de pulso entre carótida común y arteria femoral, y conocida la distancia entre dichos puntos, la VOP se calcula dividiendo el espacio recorrido en centímetros por el tiempo de tránsito en milisegundos. El valor de la VOP se expresa en metros por segundo.

Antes de la realización del procedimiento, se indicaban a los pacientes una serie de condiciones para la correcta realización de la prueba:

- Temperatura de la habitación:  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Hora del día: siempre a la misma hora.
- No fumar ni comer al menos desde 3 horas antes del estudio.
- No consumir alcohol al menos desde 10 horas antes del estudio.
- No hablar durante el procedimiento.
- Posición: decúbito supino.

## **5. Estudio y cuantificación de células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales y factores solubles en suero**

### **5.1 Obtención de las muestras**

De cada paciente se extrajeron 20 ml de sangre venosa en tubos Venoject con 150 U de heparina de litio (Terumo Europe N.V.) de la que se obtuvieron las células mononucleares y 10 ml en tubos Vacuette sin anticoagulante (Greiner bio-one GmbH) para la obtención de suero. El procesamiento de las muestras se realizó en las tres horas posteriores a su extracción.

#### Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

La muestra extraída con heparina, se diluyó al 50% con suero salino fisiológico (B. Braun Medical SA) y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación (400g, 30 minutos a temperatura ambiente) en un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep TM, Axis Shield PoC AS) (Böyum AJ, 1968). Se recogió la fase conteniendo las CMSP (linfocitos, monocitos y células NK) y se lavó dos veces con suero salino. La concentración celular se valoró mediante recuento con un microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer.

#### Obtención del suero

Las muestras de sangre periférica extraídas sin anticoagulante se centrifugaron (800g, 10 minutos a temperatura ambiente), se recogió el suero en varias alícuotas y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

## 5.2 Determinación de células endoteliales circulantes: estudio de la subpoblación de células apoptóticas

La identificación de las células endoteliales se realizó mediante inmunofluorescencia directa y análisis por citometría de flujo de la expresión diferencial de moléculas específicas en la superficie celular. Para ello las CMSP obtenidas de cada paciente se resuspendieron en PBS/EDTA (PBS/0,5% BSA-2mM EDTA) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con el anticuerpo anti-CD146 (P1H12) conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen). Este marcador permite identificar específicamente las células endoteliales y es especialmente útil cuando se usa en combinación con otros anticuerpos monoclonales, como anti-CD45/anti-CD3 conjugados con alofococianina (APC), para excluir la subpoblación de linfocitos T activados que recientemente se ha descrito expresan CD146 en la superficie celular (Elshal MF, 2005). Simultáneamente, se realizó un marcaje con los correspondientes controles isotipo que determinan las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras un lavado con PBS/EDTA, se valoró la apoptosis incubando las células con Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen) en presencia del buffer de unión rico en  $\text{Ca}^{+2}$  y 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para excluir las células necróticas. El análisis de los datos se llevó a cabo con un citómetro FACScalibur y con el software FACSDiva (BD Bioscience). Se consideraron células endoteliales apoptóticas las dobles positivas para el marcaje realizado (CD146+AnexV+) en la región de células con marcaje negativo para CD45/CD3 y 7-AAD. Los resultados se expresaron como porcentajes en base al conteo de CMSP.

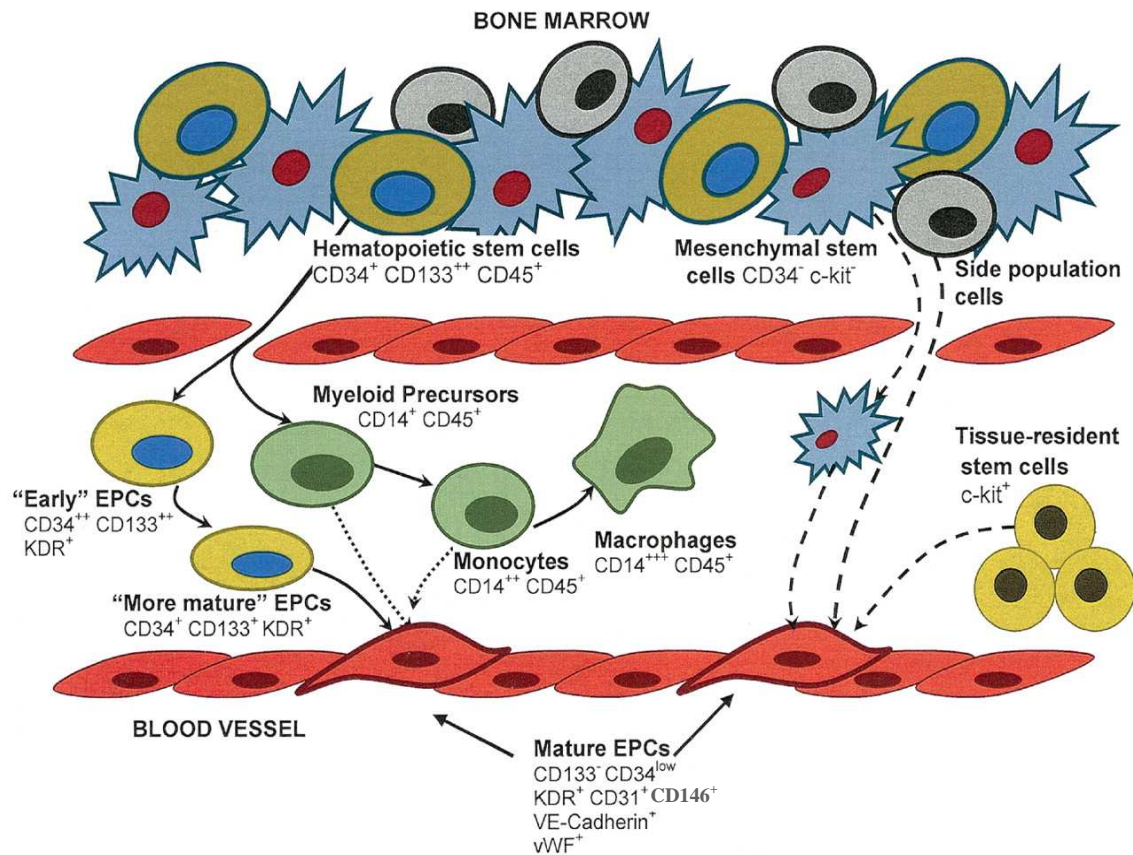
## 5.3 Determinación de las células progenitoras endoteliales circulantes

Las CPE se han definido como una subpoblación celular que coexpresa los marcadores CD34, CD309 (VEGFR-2/KDR en humanos) y CD133. El marcador CD34

lo expresan todas las células progenitoras hematopoyéticas. La expresión del antígeno CD133 parece estar restringida a las CPE más tempranas y se pierde durante el proceso de maduración a células endoteliales. El análisis diferencial de la expresión de estos marcadores permite identificar el estado de maduración de las CPE. La frecuencia de células CD34+ que coexpresan KDR y CD133 en la sangre periférica de un individuo sano es tan sólo alrededor del 0.4% del total de la población CD34+ (0.002% del total de las CMSP) (Peichev M, 2000).

La cuantificación de esta subpoblación celular tan escasa en sangre periférica se realizó usando una nueva herramienta específicamente diseñada que permite enriquecer la muestra en precursores CD34+ por un sistema de selección inmunomagnética (EPC Enrichment and Enumeration Kit, Miltenyi Biotec). Posteriormente, la fracción enriquecida de células CD34+ se incubó con suero bloqueante del receptor Fc que inhibe las uniones inespecíficas y con el siguiente cocktail de anticuerpos a las concentraciones recomendadas por el fabricante: anticuerpos anti-CD34 (FITC), anti-CD133/2 (293C3) (PE), anti-CD14 (PE-Cy5) y anti-KDR (APC) o con los correspondientes controles isotipo. Tras un lavado con PBS/EDTA, se añadió a la suspensión celular un colorante vital como el ioduro de propidio (IP) que permite excluir del análisis las células necróticas. El análisis de los datos se llevó a cabo con un citómetro FACScalibur y con el software FACSDiva (BD Bioscience) siguiendo las recomendaciones para la detección y cuantificación de CPE con esta metodología (Khan SS, 2005).

Se consideraron células progenitoras endoteliales las triples positivas para el marcaje realizado (CD34+CD133+KDR+) y negativas para el marcaje con CD14 e IP. Del mismo modo, se cuantificó la subpoblación de células progenitoras endoteliales en un estado de maduración avanzado como las células CD34+KDR+CD133- en la región con marcaje negativo para CD14 e IP. Los resultados obtenidos en cada paciente se expresaron como porcentajes en base al conteo de CMSP (Figura 3).



**Figura 3:** Origen y diferenciación de las células progenitoras endoteliales. (Shantsila E, 2007)

#### 5.4 Estudio de la expresión de factores solubles en el suero de pacientes

Se determinó la concentración de los factores solubles considerados como marcadores de activación endotelial y cuya implicación en la disfunción endotelial de los pacientes con LES se ha sugerido en los últimos años. Se cuantificaron los niveles séricos presentes en las muestras de las 46 pacientes con LES incluidas en el estudio de las siguientes proteínas:

- Citocinas inflamatorias como los interferones (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF), las interleucinas (IL-6, IL-8) y antiinflamatorias como IL-10.

- Quimiocinas como la proteína atrayente de monocitos (MCP-1).
- Factores de crecimiento como la endotelina-1 (ET-1) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).
- Moléculas de adhesión solubles como la sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina.

La cuantificación de la ET-1 se llevó a cabo mediante la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Assay designs, Stressgen). En la placa que contiene fijado anticuerpo de alta afinidad específico de ET-1 se incubaron en paralelo ocho concentraciones conocidas de la proteína y una muestra de suero de cada una de las pacientes, durante el tiempo indicado. Posteriormente se lavó y se incubó de nuevo con un anticuerpo específico de ET-1 conjugado con peroxidasa. Tras un nuevo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo se añadió el sustrato, dando lugar a un producto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de ET-1 presente en la muestra. La densidad óptica (DO) se determinó a una longitud de onda de 450nm. Se realizó una recta patrón enfrentando la DO óptica con la concentración de las muestras de las que se conocía la cantidad de proteína y se calculó la concentración de ET-1 de los sueros de las pacientes extrapolando las DO correspondientes. El rango de detección fue de 0.78-100 pg/ml.

La concentración sérica del resto de proteínas (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) se cuantificó mediante citometría de flujo con el método CBA (Cytometric Bead Array) (BD Bioscience), que permite la cuantificación simultánea de varias proteínas con una sensibilidad similar a un ELISA. El sistema emplea una combinación de microesferas fluorescentes unidas covalentemente con anticuerpos dirigidos específicamente frente a las diferentes proteínas solubles que se pretenden determinar. Posteriormente, las proteínas presentes en el suero unidas a las microesferas se detectan mediante el marcaje con



anticuerpos específicos para cada una de las moléculas a determinar conjugados con el fluorocromo PE. De este modo, se analizan los niveles de cada una de las proteínas (proporcional a la intensidad de fluorescencia del anticuerpo específico) capturadas por las diferentes microesferas (cada una de ellas caracterizada por su señal de fluorescencia particular). Finalmente, se determinó la concentración de las proteínas de interés presentes en el suero de las pacientes, extrapolando los valores de la intensidad media de fluorescencia obtenidos de cada una de las muestras en la curva patrón construida a partir de controles de concentración conocida de las proteínas (de manera similar a como se calcula en un ELISA). Las microesferas utilizadas son del sistema Flex-Set de BD Bioscience con un rango de detección de 10-2500 pg/ml y el análisis de los resultados se llevó a cabo con el software FCAP Array (BD Bioscience).

## 6. Metodología estadística

Las variables iniciales se describen en tablas con porcentajes y medias, según el tipo de variable. Las variables cuantitativas se resumen con su media y su desviación estándar (DE) o intervalo de confianza al 95% (IC 95%) o bien con la mediana y el rango intercuartílico en caso de presentar una dispersión elevada. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos. Se realizó un análisis de normalidad mediante el test de Kolmogorov.

Se estableció un GIM normal y patológico utilizando como punto de corte la mediana de los resultados obtenidos en nuestra muestra. Se estableció una VOP normal o patológica ajustando los valores por edad y tensión arterial de acuerdo con los valores de referencia publicados por la Sociedad Europea de Cardiología (2010).

Considerando la VOP y el GIM como las variables dependientes del estudio, se realizaron las pruebas estadísticas contrastando el resto de las variables frente a los niveles de VOP o GIM. Se empleó la prueba t de student en el caso de comparación de dos muestras de variables continuas y la prueba de Mann-Whitney para el mismo tipo de datos si se rechazan dichas hipótesis. Para comparar las variables categóricas se utilizó la prueba  $\chi^2$  normal o  $\chi^2$  corregida por Yates en el caso de frecuencias esperadas <5. Las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante ( $P < 0,05$ ), se analizaron en un modelo de regresión logística múltiple. Este método de regresión es una técnica convencional que investiga la relación entre una variable dependiente binaria (VOP normal/patológica) y una serie de variables pronósticos de la enfermedad. Se estimó la “odds ratio” (OR, razón de ventajas) junto a su IC 95% de cada una de las variables sobre el riesgo de VOP patológico. La estrategia utilizada en la selección de las variables es la llamada “backward stepwise” que consiste en construir un modelo con todas las variables

predictoras e ir eliminando hasta que dejen de cumplir los niveles de significación exigidos por el análisis ( $P < 0,15$ ). Los datos fueron almacenados en el programa Excel y tratados mediante el paquete estadístico SPSS V.14.0.

## *Resultados*

## 1. Resultados generales descriptivos

Las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio y los datos relacionados con los factores de riesgo clásicos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Características basales de los pacientes en cuanto a factores de riesgo clásicos.

	Pacientes (N=46)
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	25,4 ± 5,5
Circunferencia abdominal (cm)	88,2 ± 15,3
PA sistólica (mmHg)	113,2 ± 16,8
PA diastólica (mmHg)	70,6 ± 9,7
Glucemia basal (mg/dl)	91,3 ± 14,2
Colesterol total (mg/dl)	184,7 ± 39,5
Colesterol LDL (mg/dl)	108 ± 29,5
Colesterol HDL (mg/dl)	55 ± 16
Triglicéridos (mg/dl)	104,8 ± 54,7
Ácido úrico (mg/dl)	5 ± 1,9
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,3
Urea (mg/dl)	39 ± 16,7
Aclaramiento de Creatinina (ml/min)	94,5 ± 31,2
Microalbúmina/Creatinina (mg/g)	90,37 ± 189
PCRas (mg/l)	3,1 ± 6
Homocisteína (μmol/l)	13,8 ± 5
Dímero D (μg/l)	0,4 ± 0,2
Fibrinógeno (mg/dl)	360 ± 76,4
Síndrome metabólico (%)	28
HeartScore®=1 (%)	93,5
<b>Factores de riesgo clásicos (%)</b>	
Hipertensión arterial	26
Diabetes	9
Hipercolesterolemia	50
Tabaco	26
Historia familiar de ECV	17,5
<b>Tratamiento (%)</b>	
Antihipertensivos	28,3
Estatinas	28,3
AAS	45,6

Valores mostrados como media ± desviación estándar o como porcentaje. AAS: ácido acetil salicílico. ECV: enfermedad cardiovascular.

En relación a los factores de riesgo clásicos, 12 pacientes no tenían ningún factor, 17 pacientes presentaban un factor de riesgo, 11 pacientes presentaban dos, 4 pacientes presentaban tres y 2 pacientes presentaban 4. El factor de riesgo más frecuente entre nuestras pacientes fue la hipercolesterolemia, seguido de la hipertensión arterial y el tabaquismo con el mismo porcentaje y por último la diabetes.

Así mismo, el porcentaje de síndrome metabólico encontrado en la muestra fue de 28% y el riesgo cardiovascular calculado por el HeartScore® era bajo; el 93,5% de las pacientes tenían un riesgo de 1% de muerte cardiovascular en los siguientes 10 años.

Siete pacientes presentaban enfermedad cardiovascular establecida, alguna de ellas con afectación de varios órganos. Sólo una paciente (2%) tenía historia de enfermedad coronaria, con enfermedad de un sólo vaso coronario. Tres pacientes (6,5%) presentaban arteriopatía periférica. Seis pacientes (13%) tenían historia de enfermedad cerebrovascular; en la mitad de ellas el accidente cerebrovascular fue secundario a un síndrome antifosfolípido por lo que permanecían con tratamiento anticoagulante. De las seis pacientes, tres (6,5%) habían sufrido un accidente isquémico transitorio (AIT) y tres (6,5 %) un ictus establecido, de las cuáles sólo una paciente mantenía secuelas del episodio.

Las características en cuanto al LES, los parámetros bioquímicos e inmunológicos y los tratamientos se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características basales de los pacientes en cuanto a factores relacionados con el LES.

	Pacientes (N=46)
Leucocitos (x microL)	5,39 ± 1,9
Linfocitos (x microL)	1,6 ± 0,6
Plaquetas (x microL)	231 ± 65
VSG (mm)	17,4 ± 16,6
C3 (mg/dl)	106,4 ± 25,7
C4 (mg/dl)	17,5 ± 8,2
ANA (% positivo)	89
Anti-DNA (% positivo)	45,6
Anti-ENA (% positivo)	54,3
Anticoagulante lúpico (% positivo)	26,1
Anticuerpos anticardiolipina (% positivo)	28,2
Anticuerpos anti $\beta$ 2glicoproteína (% positivo)	28,2
SLEDAI $\leq$ 4 (%)	84,7
SLICC/ACR = 0 (%)	28,2
<b>Tratamiento actual (%)</b>	
Antimaláricos únicamente	30,4
Inmunosupresores únicamente	4,3
Antimaláricos + Inmunosupresores	47,9
Sin tratamiento	17,4

SLEDAI  $\leq$  4: enfermedad inactiva. SLICC/ACR = 0: sin daño acumulado

Nueve pacientes (19,5%) presentaban actividad serológica del LES, considerada como la presencia de anticuerpos antiDNA positivos y cifras de complemento bajas. Veinte pacientes (43,4%) presentaban criterios de laboratorio de síndrome antifosfolípido, aunque no todas estas pacientes tenían criterios clínicos de dicho síndrome.

En cuanto al tratamiento que estaban recibiendo las pacientes en el momento del estudio, podemos destacar que 36 pacientes (78,3%) tomaban antimaláricos de forma habitual ya fuese como tratamiento exclusivo o de forma combinada con algún

inmunosupresor, 24 pacientes (52,2%) estaban bajo tratamiento con algún inmunosupresor, de forma única o en combinación con antimaláricos, incluyendo en este grupo a los corticoides, 22 pacientes (47,9%) recibían los dos tipos de tratamientos y 8 pacientes (17,4%) se encontraban actualmente sin tratamiento.



## 2. Velocidad onda de pulso como medida de arteriosclerosis subclínica

### 2.1 Relación de la VOP con los factores de riesgo clásicos

La VOP media en nuestra muestra fue de 7,8 m/s  $\pm$  2,2. La VOP se correlacionó de forma significativa con la edad ( $r=0,7$ ;  $p=0,0001$ ) y con la tensión arterial (TA) ( $r=0,41$ ;  $p=0,006$ ). Por este motivo, para el presente estudio, se dividió a las pacientes en dos grupos según su resultado de VOP, ajustado a edad y TA, basándonos en los estándares de normalidad publicados por la Sociedad Europea de Cardiología (Boutouyrie P, 2010). Veintitrés pacientes tenían una VOP normal y veintitrés pacientes tenían una VOP patológica. La relación de la VOP con los factores de riesgo clásicos está resumida en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación de los factores de riesgo clásicos con la VOP.

Variable	VOP normal (N=23)	VOP patológica (N=23)	p
Edad	40,9 $\pm$ 13,6	49 $\pm$ 9,7	<b>0,02</b>
Fumador	5 (21,7%)	7 (30,4%)	NS
HTA	1 (4,3%)	11 (47,8%)	<b>0,001</b>
Síndrome metabólico	2 (8,7%)	11 (47,8%)	<b>0,007</b>
Diabetes	0 (0%)	4 (8,7%)	NS
Dislipemia	10 (43,5%)	13 (56,5%)	NS
Colesterol-LDL (mg/dl)	104,4 $\pm$ 32,7	111,6 $\pm$ 26,1	NS
Colesterol-HDL (mg/dl)	58,7 $\pm$ 17,5	51,3 $\pm$ 13,5	NS
Hipertrigliceridemia	0 (0%)	9 (39,1%)	<b>0,001</b>
Homocisteína ( $\mu$ mol/l)	11,9 $\pm$ 3,1	15,6 $\pm$ 5,7	<b>0,01</b>
PCRas (mg/l)	1,2 $\pm$ 1,6	5,1 $\pm$ 8	<b>0,03</b>
Ácido úrico (mg/dl)	4,3 $\pm$ 1,2	5,7 $\pm$ 2,2	<b>0,01</b>
Aclaramiento creatinina (ml/min)	102,6 $\pm$ 29,8	86,5 $\pm$ 31	NS
Microalbúmina/creatinina (mg/g)	70,2 $\pm$ 202,3	110,5 $\pm$ 176,8	NS

HTA: hipertensión arterial. NS: no significativo. PCRas: proteína C reactiva de alta sensibilidad. VOP: velocidad de onda de pulso

Las pacientes con una VOP patológica tenían más edad y con más frecuencia hipertensión arterial que aquellas con una VOP normal. Además, tenían de forma estadísticamente significativa, niveles más altos de homocisteína ( $11,9 \pm 3,1$  vs  $15,6 \pm 5,7$ ;  $p=0,01$ ), PCRas ( $1,2 \pm 1,6$  vs  $5,1 \pm 8,0$ ;  $p=0,03$ ) y ácido úrico ( $4,3 \pm 1,2$  vs  $5,7 \pm 2,2$ ;  $p=0,01$ ) y con más frecuencia presentaban hipertrigliceridemia ( $p=0,001$ ) y síndrome metabólico ( $p=0,007$ ).

## 2.2 Relación de la VOP con los factores de riesgo del LES

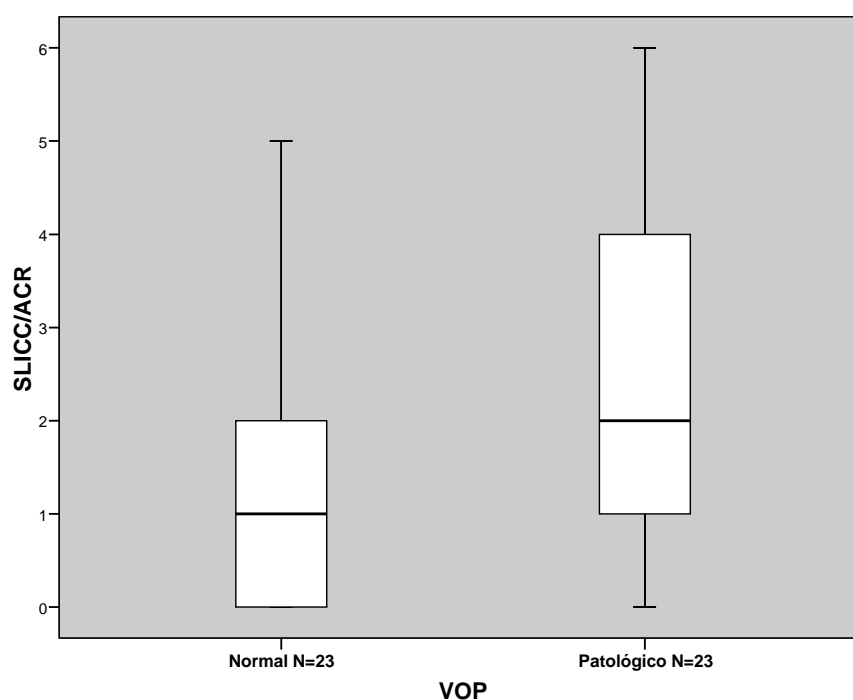
No se encontraron diferencias en cuanto a la VOP entre las pacientes con enfermedad activa e inactiva, sin embargo si existieron diferencias en relación al índice de daño acumulado, encontrándose que el aumento de la rigidez arterial estaba asociado con una mayor puntuación en el SLICC/ACR ( $1,2 \pm 1,4$  vs  $2,6 \pm 1,2$ ;  $p=0,006$ ). Se realizó el mismo análisis pero excluyendo a las siete pacientes de la muestra que habían presentado algún evento cardiovascular y se siguió encontrando asociación entre el aumento de rigidez y el SLICC/ACR ( $1,1 \pm 1,4$  vs  $2,2 \pm 1,7$ ;  $p=0,039$ ). En cuanto a la presencia de los diferentes autoanticuerpos no se encontraron diferencias significativas. Los resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación de los factores de riesgo relacionados con el LES y la VOP.

Variable	VOP normal (N=23)	VOP patológica (N=23)	p
SLEDAI $\leq$ 4	19 (82,6%)	20 (87%)	NS
SLEDAI $>$ 5	4 (17,4%)	3 (13%)	NS
SLICC/ACR	1,2 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 1,2	<b>0,006</b>
ANA positivo	21 (91,3%)	20 (87%)	NS
Complemento 3 (mg/dl)	104 $\pm$ 20,2	108,2 $\pm$ 30,5	NS
Complemento 4 (mg/dl)	16,2 $\pm$ 7,8	18,7 $\pm$ 8,3	NS
VSG (mm)	12,2 $\pm$ 7,8	18,7 $\pm$ 8,3	NS
Anti-DNA positivo	10 (43,5%)	11 (47,8%)	NS
Anti-ENA positivo	12 (52,2%)	13 (56,5%)	NS
Anticoagulante lúpico	4 (17,4%)	5 (25,0%)	NS
Ac. anticardiolipina (Ig G)	5 (21,7%)	5 (21,7%)	NS
Ac. anti $\beta$ 2gp1 (Ig G)	4 (17,4%)	4 (17,4%)	NS

Ac: anticuerpos. SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index. SLICC/ACR: systemic lupus internacional collaborating clinics. VSG: velocidad de sedimentación globular.

En la Figura 4 se representa el valor del SLICC/ACR en los dos grupos de pacientes teniendo en cuenta el resultado de la VOP.



**Figura 4: Diferencia en la escala SLICC/ACR de daño acumulado entre las pacientes con VOP normal o patológica.** Las cajas representan el rango intercuartil (IQR). La línea horizontal dentro de la caja es la mediana. Las líneas por encima y por debajo de las cajas representan el valor mínimo y máximo.

### 2.3 Relación de la VOP con los tratamientos

Para analizar la posible asociación de la VOP con los diferentes tratamientos, se utilizó tanto el tratamiento realizado a lo largo de toda la evolución de la enfermedad como el tratamiento actual (ver tablas 4 y 5 del apartado materiales y métodos).

Con respecto al tratamiento realizado a lo largo de toda la evolución de la enfermedad, el grupo tratado era más numeroso (44 pacientes con tratamiento vs 2 pacientes sin tratamiento), por lo que se decidió analizar si existía alguna diferencia

entre los distintos tipos de tratamientos y se dividió a las pacientes en dos grupos según la toma de inmunosupresores. No hubo diferencias entre las pacientes con antimaláricos sólo (n=5) y las que tenían tratamiento con antimaláricos e inmunosupresores (n=36) ( $p>0,05$ ).

Tampoco se encontraron diferencias al analizar el tratamiento actual.

En cuanto al tratamiento con estatinas, no encontramos diferencias en la VOP entre aquellas pacientes con estatinas (n=12) y sin estatinas (n=34) ( $p>0,05$ ).

#### 2.4 Relación de la VOP con las CPE y células endoteliales apoptóticas

Las concentraciones de los progenitores de las células endoteliales y de las células endoteliales apoptóticas circulantes en sangre periférica que se midieron respecto a la VOP se muestran en la tabla 10.

No se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de células endoteliales apoptóticas y células progenitoras hematopoyéticas CD34+, pero sí encontramos que las pacientes con VOP normal presentaban un porcentaje significativamente mayor de células progenitoras endoteliales triples positivas CD34+/CD133+/KDR+ ( $0,9 \pm 0,4$  vs  $0,7 \pm 0,6$ ;  $p=0,01$ ), células progenitoras endoteliales maduras CD34+/KDR+/CD133- ( $0,4 \pm 0,2$  vs  $0,3 \pm 0,2$ ;  $p=0,04$ ) y en la población que engloba a las células progenitoras en ambos estados de maduración CD34+/KDR+ ( $1,3 \pm 0,6$  vs  $1,0 \pm 0,8$ ;  $p=0,01$ ).

Tabla 10. Diferencias en la cuantificación de células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas en relación a la VOP

Variable (%)	VOP normal (N=23)	VOP patológica (N=23)	p
CD146+/AnexV+	0,05 ± 0,06	0,07 ± 0,08	NS
CD34+	13,3 ± 9	12,8 ± 8,4	NS
CD34+/CD133+/KDR+	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,6	<b>0,01</b>
CD34+/KDR+/CD133-	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	<b>0,04</b>
CD34+/KDR+	1,3 ± 0,6	1,0 ± 0,8	<b>0,01</b>

CD146+/AnexV+: células endoteliales apoptóticas. CD34+: células progenitoras hematopoyéticas.  
 CD34+/CD133+/KDR+: células progenitoras endoteliales. CD34+/KDR+/CD133-: células progenitoras endoteliales maduras. CD34+/KDR+: células progenitoras endoteliales totales.

En la figura 5 se muestra el porcentaje de CPE totales en los dos grupos de pacientes según la VOP.

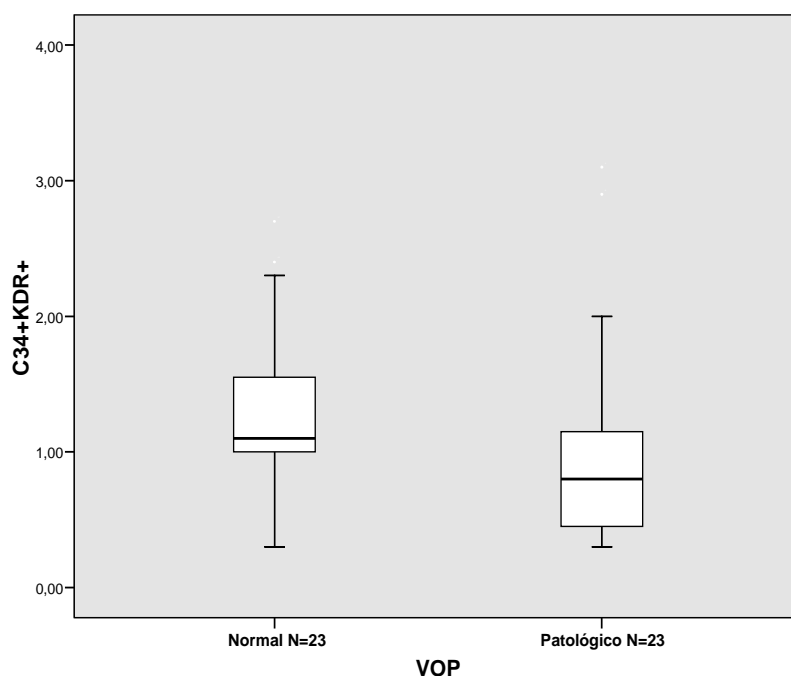
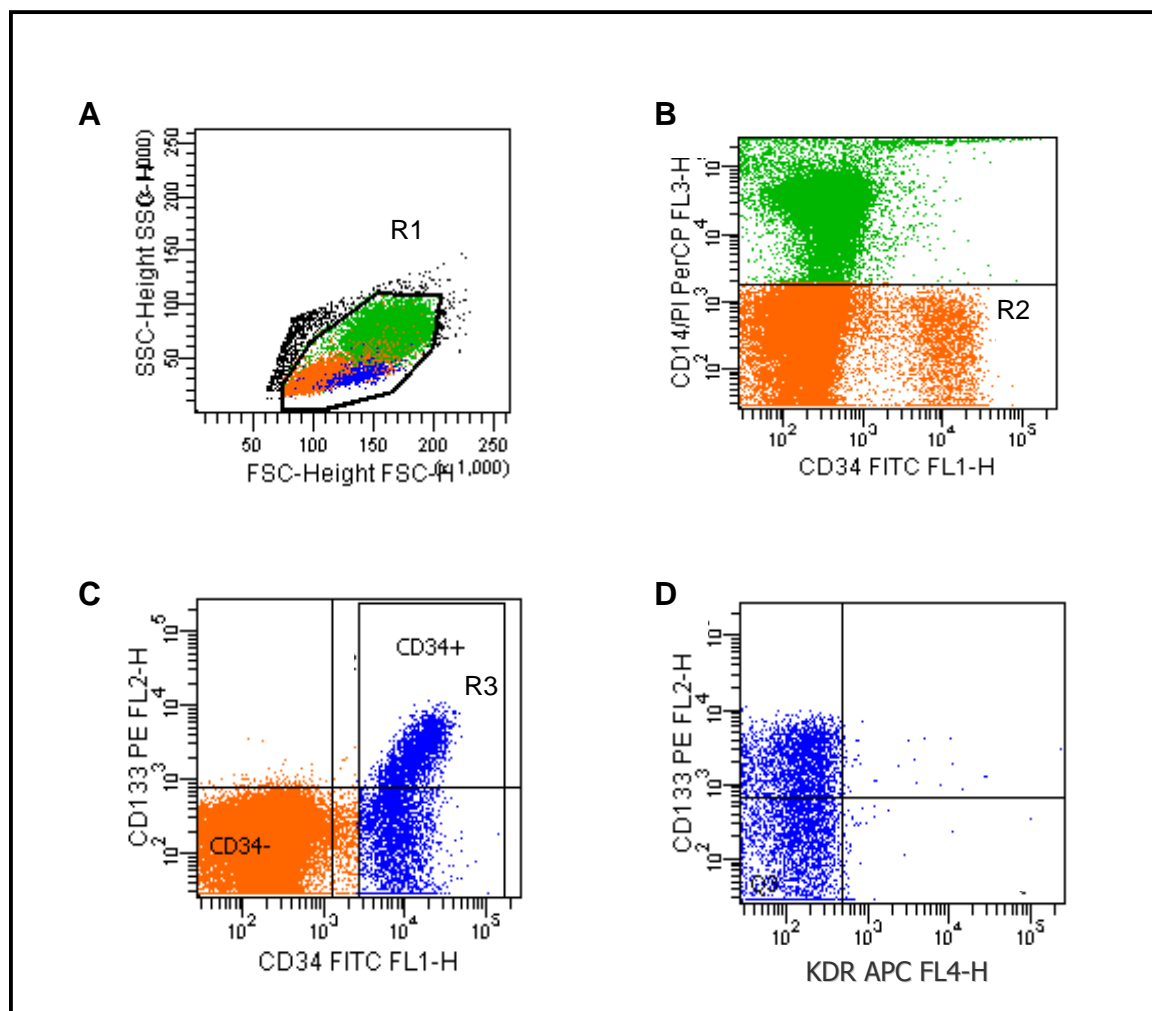


Figura 5: Diferencia entre el porcentaje de células progenitoras endoteliales CD34+/KDR+ en sangre periférica, de las pacientes con LES con VOP normal y patológica. Las cajas representan el rango intercuartil (IQR). La línea horizontal dentro de la caja es la mediana. Las líneas por encima y por debajo de las cajas representan el valor mínimo y máximo.

En la figura 6 se representa un ejemplo de la determinación de las células progenitoras endoteliales mediante citometría de flujo.



**Figura 6: Ejemplo representativo de la determinación de las CPE en una paciente del estudio.**

**A.** En la región 1 (R1) se seleccionaron las células mononucleares de sangre periférica. **B.** Tras la exclusión de las células muertas (IP+) y los monocitos (CD14+) –representadas en la figura-, se seleccionaron las células de la región R2. **C.** En la región R3 se seleccionó la subpoblación de células CD34+ (representadas en azul). **D.** Se representa las células incluidas en R3. En el cuadrante superior derecho se sitúan las células progenitoras endoteliales triples positivas CD34+CD133+KDR+ y en el cuadrante inferior derecho las células progenitoras endoteliales CD34+KDR+.

## 2.5 Relación de la VOP con los marcadores inflamatorios

Las concentraciones de los distintos marcadores inflamatorios que se midieron respecto a la VOP se muestran en la tabla 11. Las concentraciones de IL-8 mostraban una diferencia entre los grupos que rozaba la significación estadística. Con el resto de citocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento no se encontraron diferencias.

Tabla 11. Diferencias en la cuantificación de marcadores inflamatorios en relación a la VOP.

Variable (pg/ml)	VOP normal (N=23)	VOP patológica (N=23)	p
IL-8	11,4 ± 6,4	14,5 ± 7,4	<b>0,053</b>
IFN $\alpha$	3,3 ± 3,7	2,5 ± 2,4	NS
TNF	1,4 ± 1,6	1 ± 1,6	NS
IFN $\gamma$	1,8 ± 2,9	2,8 ± 8,2	NS
IL-6	3,8 ± 3,4	4,1 ± 3,2	NS
VEGF	116,4 ± 91,5	110,9 ± 93,3	NS
MCP-1	207,1 ± 503,8	171,7 ± 214,5	NS
ET-1	787,7 ± 2029	686,9 ± 657,8	NS
IL-10	6,2 ± 11,5	30,8 ± 89,4	NS
E-selectina	4503,8 ± 3147,2	3890,1 ± 2445,4	NS
ICAM-1	143,4 ± 217,6	123,4 ± 85,4	NS
VCAM-1	96,9 ± 19,4	103,4 ± 23,1	NS

IL-8: Interleucina 8. IFN $\alpha$ : Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN  $\gamma$ : Interferon gamma. IL-6: interleucina 6. VEGF: factor de crecimiento endotelial. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. IL-10: Interleucina 10. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.



## 2.6 Análisis multivariante

Se realizó un análisis multivariante para conocer cuáles eran las variables que de forma independiente se asociaban a un aumento de la rigidez arterial. Tras eliminar las variables que no cumplían la significación estadística, resultaron como variables independientes la presencia de síndrome metabólico y la escala de SLICC/ACR.

Se calculó la Odds Ratio para el síndrome metabólico obteniendo un resultado de 6,6 (IC 95% 1,2 – 38;  $p=0,03$ ), lo que significa que la presencia de síndrome metabólico en una paciente con LES aumenta 6,6 veces la posibilidad de tener una VOP patológica y por tanto mayor rigidez arterial y para la escala SLICC/ACR un resultado de 1,5 (IC 95% 1 - 2,32;  $p=0,05$ ) siendo el significado similar al anterior.

Se decidió realizar otro análisis excluyendo el síndrome metabólico y el SLICC/ACR por tratarse de scores de puntuación que aglutinan una gran cantidad de variables y por lo tanto en el análisis multivariante prevalecen sobre éstas. Con este análisis, resultaron como variables independientes (teniendo en cuenta una  $p<0,15$ ) la homocisteína con una OR=1,2 (IC 95% 1,02-1,42;  $p=0,03$ ), la IL-8 con una OR= 1,1 (IC 95% 0,97-1,25;  $p=0,12$ ) y las CPE CD34+/KDR+ con una OR= 0,41 (IC 95% 0,14-1,24;  $p=0,11$ ).

### 3. Grosor Intima-Media (GIM) como medida de arteriosclerosis subclínica

#### 3.1 Correlación entre el GIM y la VOP

Se calculó la correlación existente entre la VOP y el GIM carotídeo obteniéndose una correlación positiva con una  $r=0,44$  y  $p=0,002$ . La media del GIM en nuestra muestra fue de  $0,54 \pm 0,09$  mm.

#### 3.2. Relación entre el grosor íntima-media y las células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas circulantes

Se estableció como punto de corte para el GIM la mediana de nuestra muestra, obteniéndose dos grupos según GIM menor o mayor de 0,55 mm. Veintiséis pacientes tenían un GIM menor de 0,55 mm y en el grupo de mayor o igual de 0,55 mm había 20 pacientes. Las pacientes que tenían un GIM mayor presentaban un porcentaje más elevado de células endoteliales apoptóticas con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,03$ ), pero no se encontró relación con las CPE (Tabla 12).

Tabla 12. Diferencias en la cuantificación de células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas en relación al grosor íntima-media.

Variable (%)	GIM < 0,55 (N=26)	GIM ≥ 0,55 (N=20)	p
CD146+/AnexV+	$0,03 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,08$	<b>0,03</b>
CD34+	$12,9 \pm 9,6$	$13,2 \pm 7,4$	NS
CD34+/CD133+/KDR+	$0,7 \pm 0,44$	$0,7 \pm 0,6$	NS
CD34+/KDR+/CD133-	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	NS
CD34+/KDR+	$1,1 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,8$	NS

CD146+/AnexV+: células endoteliales apoptóticas. CD34+: células progenitoras hematopoyéticas. CD34+/CD133+/KDR+: células progenitoras endoteliales. CD34+/KDR+/CD133-: células progenitoras endoteliales maduras. CD34+/KDR+: células progenitoras endoteliales totales.

### 3.3 Relación entre el grosor íntima-media y marcadores inflamatorios solubles

Al igual que en apartado anterior, se estableció como punto de corte para el GIM la mediana de nuestra muestra, obteniéndose dos grupos según GIM menor o mayor o igual a 0,55 mm. Se observaron diferencias significativas en la cuantificación de E-selectina que estaba incrementada en las pacientes con un GIM mayor ( $p=0,01$ ), pero no con el resto de los marcadores inflamatorios (Tabla 13).

Tabla 13. Diferencias en la cuantificación de marcadores inflamatorios en relación al GIM.

Variable (pg/ml)	GIM < 0,55 (N=26)	GIM ≥ 0,55 (N=20)	p
IL-8	11,4 ± 5,2	14,9 ± 8,5	NS
IFNα	3,5 ± 3,5	2,1 ± 2,4	NS
TNF	1,2 ± 1,7	1,1 ± 1,4	NS
IFNγ	3,0 ± 8,0	1,4 ± 1,6	NS
IL-6	3,5 ± 2,9	4,4 ± 3,7	NS
VEGF	103,6 ± 83,4	126,6 ± 101,6	NS
MCP-1	111,8 ± 81,0	290,3 ± 566,0	NS
ET-1	438,6 ± 333,2	1125,6 ± 2279,8	NS
IL-10	14,7 ± 45,1	23,4 ± 83,9	NS
E-selectina	3112,7 ± 1726,2	5606,5 ± 3316,7	<b>0,01</b>
ICAM-1	96,0 ± 48,9	182,2 ± 236,5	NS
VCAM-1	103,7 ± 15,4	95,5 ± 27,0	NS

IL-8: Interleucina 8. IFNα: Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN γ: Interferon gamma. IL-6: interleucina 6. VEGF: factor de crecimiento endotelial. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. IL-10: Interleucina 10. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.

#### 4. Placa carotídea como medida de arteriosclerosis subclínica

##### 4.1 Relación entre la existencia de placa y no placa con las células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas circulantes

Como se muestra en la tabla 14 no existen diferencias entre el porcentaje de las subpoblaciones celulares determinadas con la presencia o no de placa carotídea en nuestras pacientes. Sin embargo se observa una tendencia a que las pacientes sin placa carotídea tienen más células progenitoras endoteliales circulantes que las pacientes con placa establecida.

Tabla 14. Diferencias en la cuantificación de células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas en relación a la existencia de placa carotídea.

Variable (%)	No Placa (N=37)	Placa (N=9)	p
CD146+/AnexV+	0,06 ± 0,08	0,05 ± 0,06	NS
CD34+	12,83 ± 9,83	14,06 ± 6,51	NS
CD34+/CD133+/KDR+	0,84 ± 0,55	0,53 ± 0,35	NS
CD34+/KDR+/CD133-	0,39 ± 0,21	0,33 ± 0,33	NS
CD34+/KDR+	1,24 ± 0,70	0,87 ± 0,62	NS

CD146+/AnexV+: células endoteliales apoptóticas. CD34+: células progenitoras hematopoyéticas. CD34+/CD133+/KDR+: células progenitoras endoteliales. CD34+/KDR+/CD133-: células progenitoras endoteliales maduras. CD34+/KDR+: células progenitoras endoteliales totales.

##### 4.2 Relación entre la existencia de placa y no placa con los marcadores inflamatorios solubles

En cuanto a la relación entre la existencia de placa y los factores solubles, se encontraron mayores concentraciones de IL-8 e ICAM-1 en aquellas pacientes con placa y de IFN $\alpha$  en las pacientes sin placa (Tabla 15).

Tabla 15. Diferencias en la cuantificación de marcadores inflamatorios en relación a la existencia de placa carotídea.

Variable (pg/ml)	No Placa (N=37)	Placa (N=9)	p
IL-8	11,6 ± 5,4	18,7 ± 9,8	<b>0,01</b>
IFN $\alpha$	3,4 ± 3,3	1,0 ± 1,1	<b>0,01</b>
TNF	1,4 ± 1,7	0,4 ± 0,9	NS
IFN $\gamma$	2,6 ± 6,8	1,2 ± 1,0	NS
IL-6	3,7 ± 3,5	4,5 ± 2,1	NS
VEGF	113,6 ± 96,0	114,0 ± 74,2	NS
MCP-1	109,6 ± 76,5	517,4 ± 805,9	NS
ET-1	419,4 ± 321,8	2044,1 ± 3241,0	NS
IL-10	11,5 ± 37,9	47,2 ± 124,8	NS
E-selectina	3860,9 ± 2649,1	5578,4 ± 3158,4	NS
ICAM-1	101,2 ± 68,2	265,8 ± 324,6	<b>0,01</b>
VCAM-1	100 ± 19,6	97,7 ± 28,8	NS

IL-8: Interleucina 8. IFN $\alpha$ : Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN  $\gamma$ : Interferon gamma. IL-6: interleucina 6. VEGF: factor de crecimiento endotelial. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. IL-10: Interleucina 10. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.

## 5. Relación de las CPE, células endoteliales apoptóticas y marcadores inflamatorios

### 5.1 Relación entre las concentraciones de CPE, células endoteliales apoptóticas y marcadores inflamatorios solubles con los factores de riesgo cardiovasculares clásicos

Si dividimos a nuestras pacientes según presenten determinados factores de riesgo clásicos observamos que existen diferencias en cuanto a la concentración de las CPE. Así las pacientes con **hábito tabáquico** tenían menos CPE que aquellas que no fumaban (CD34+/CD133+/KDR+  $0,89 \pm 0,5$  vs  $0,47 \pm 0,2$ ;  $p=0,008$ ), las pacientes con **HTA** también tenían menos concentración de CPE que las no hipertensas (CD34+/KDR+  $1,2 \pm 0,7$  vs  $0,8 \pm 0,3$ ;  $p=0,03$ ). Las pacientes que presentaban una **glucemia alterada en ayunas** tenían menos CPE respecto a las que tenían una glucemia normal (CD34+/CD133+/KDR+  $0,84 \pm 0,53$  vs  $0,40 \pm 0,21$ ;  $p=0,02$ ) y además, tenían más células endoteliales apoptóticas ( $p=0,03$ ). También se comprobó que las pacientes con **historia familiar de enfermedad cardiovascular** presentaban cantidades menores de células progenitoras hematopoyéticas que aquellas sin antecedentes familiares (CD34+  $11,8 \pm 0,8$  vs  $18,6 \pm 9,7$ ;  $p=0,05$ ) aunque no había diferencias en cuanto al porcentaje de CPE. En cuanto a la presencia de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia no hubo diferencias significativas.

En cuanto a las correlaciones entre las CPE y las determinaciones de otros factores determinantes en el riesgo cardiovascular, definidos como variables cuantitativas, observamos correlación positiva entre los niveles de HDL-col y niveles de CPE ( $r=0,32$ ;  $p=0,02$ ) y con los niveles de colesterol total ( $r=0,36$ ;  $p=0,01$ ) y correlaciones inversas con los niveles de PCRas ( $r=-0,35$ ;  $p=0,01$ ) y niveles de fibrinógeno ( $r=-0,29$ ;  $p=0,05$ ).

Existen diferencias también en la concentración de citocinas y moléculas de adhesión en relación a estos mismos factores. En el análisis de los datos, encontramos que las pacientes **fumadoras** tenían menor concentración de ICAM-1 que las pacientes no fumadoras. En relación a la **tensión arterial**, se observó que las pacientes hipertensas tenían mayores concentraciones de VCAM-1, de IL-8, de MCP-1 y de ET-1 y menores concentraciones de TNF. En cuanto a la diabetes y al colesterol no hubo diferencias significativas, pero sí en relación a la presencia de **hipertrigliceridemia**, aquellas pacientes con triglicéridos altos tenían mayores concentraciones de IL-8 y de IFN $\gamma$  y menores de INF $\alpha$  y de TNF (Tabla 16).

Tabla 16. Diferencias en la cuantificación de factores solubles en relación a los factores de riesgo cardiovascular.

<b>Fumador</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
ICAM-1	122,7 $\pm$ 181,1	163,8 $\pm$ 99,4	0,01
<b>HTA</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
IL-8	17,1 $\pm$ 9,1	11,5 $\pm$ 5,5	0,02
TNF	0,4 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 5,5	0,02
MCP-1	243,9 $\pm$ 272,7	170,1 $\pm$ 417,2	0,04
ET-1	975,0 $\pm$ 1091,0	653,0 $\pm$ 1677,4	0,03
VCAM-1	112,0 $\pm$ 21,5	95,9 $\pm$ 19,9	0,04
<b>Hipertrigliceridemia</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
IL-8	18,2 $\pm$ 10,2	11,7 $\pm$ 5,4	0,04
INF $\alpha$	1,6 $\pm$ 2,3	1,4 $\pm$ 1,7	0,04
TNF	0,1 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 1,7	0,01
IFN $\gamma$	4,5 $\pm$ 13,2	1,8 $\pm$ 2,5	0,01

Los resultados están expresados en pg/ml. IL-8: Interleucina 8. INF $\alpha$ : Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN $\gamma$ : Interferon gamma. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.

Las correlaciones entre la concentración de citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión con los niveles de otros factores de riesgo cardiovascular se resumen en la tabla 17. Sólo se representan los resultados con significación estadística.

Tabla 17. Correlaciones entre la concentración de marcadores inflamatorios solubles y factores de riesgo cardiovascular.

	<b>Correlaciones</b>	<b>Coeficiente de correlación (r)</b>	<b>p</b>
IL-8	Ácido úrico	0,44	0,002
INF $\alpha$	Microalbúmina/creatinina	-0,35	0,01
TNF	PCRas	-0,33	0,02
	Microalbúmina/creatinina	-0,42	0,003
IL-6	Homocisteína	0,32	0,03
	PCRas	0,46	0,001
	Ácido úrico	0,42	0,003
VEGF	HDL-col	0,30	0,03
	Ácido úrico	0,31	0,03
MCP-1	Homocisteína	0,33	0,02
	Ácido úrico	0,33	0,02
Endotelina-1	Homocisteína	0,32	0,03
	Ácido úrico	0,34	0,01
	Aclaramiento de creatinina	-0,30	0,04
VCAM-1	Fibrinógeno	0,39	0,007
	Microalbúmina/creatinina	0,39	0,006
ICAM-1	HDL-col	-0,31	0,03
	PCRas	0,32	0,02
	Fibrinógeno	0,40	0,006
	Ácido úrico	0,30	0,03

IL-8: Interleucina 8. INF $\alpha$ : Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IL-6: interleucina 6. VEGF: factor de crecimiento endotelial. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.



### 5.1.1 Comparación de las concentraciones de células progenitoras endoteliales circulantes y marcadores inflamatorios solubles en las pacientes con o sin síndrome metabólico

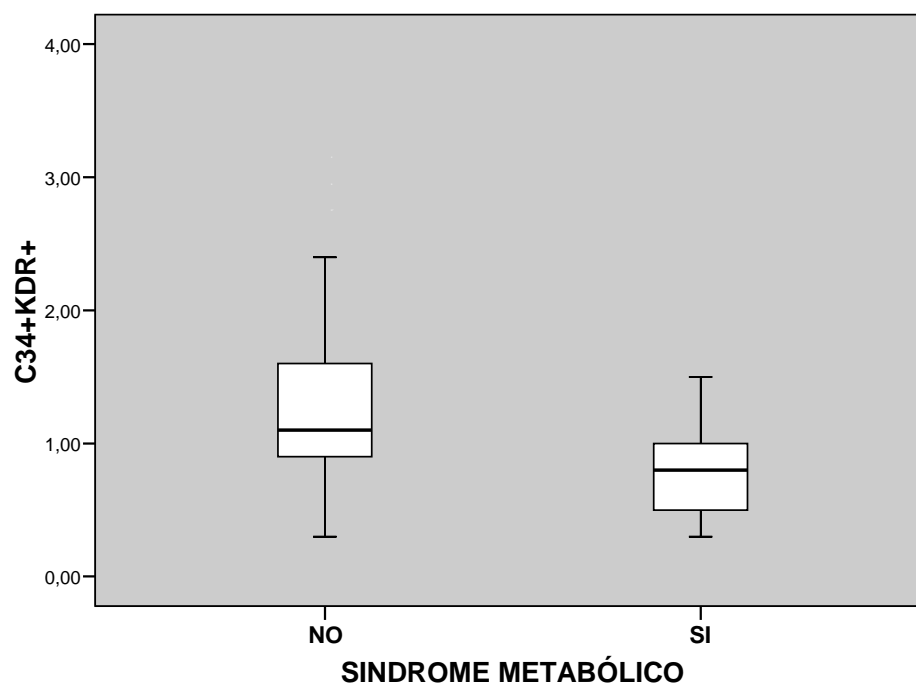
Se decidió dividir a las pacientes según la presencia o no de síndrome metabólico y estudiar las concentraciones de las células progenitoras endoteliales y de las células endoteliales apoptóticas circulantes. En los resultados obtenidos se comprobó que las pacientes sin criterios de síndrome metabólico tenían cifras más elevadas de CPE en todos los estados madurativos que las pacientes con síndrome metabólico con una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 18).

Tabla 18. Concentraciones de CPE en las pacientes con y sin síndrome metabólico (SM)

Variable (%)	Pacientes con SM (N=13)	Pacientes sin SM (N=33)	p
CD146+/AnexV+ (%)	0,04 ± 0,06	0,06 ± 0,07	NS (0,5)
CD34+ (%)	11,0 ± 8,51	13,8 ± 8,67	NS (0,2)
CD34+/CD133+/KDR+ (%)	0,52 ± 0,25	0,88 ± 0,57	<b>0,02</b>
CD34+/KDR+/CD133- (%)	0,26 ± 0,12	0,42 ± 0,26	<b>0,04</b>
CD34+/KDR+ (%)	0,79 ± 0,33	1,30 ± 0,74	<b>0,01</b>

CD146+/AnexV+: células endoteliales apoptóticas. CD34+: células progenitoras hematopoyéticas. CD34+/CD133+/KDR+: células progenitoras endoteliales. CD34+/KDR+/CD133-: células progenitoras endoteliales maduras. CD34+/KDR+: células progenitoras endoteliales totales.

En la figura 7 se representa la diferencia de la subpoblación de células progenitoras endoteliales totales (CD34+KDR+) cuantificadas en relación a la presencia de síndrome metabólico.



**Figura 7: Diferencias en el porcentaje de células progenitoras endoteliales y la presencia de síndrome metabólico.** Las cajas representan el rango intercuartil (IQR). La línea horizontal dentro de la caja es la mediana. Las líneas por encima y por debajo de las cajas representan el valor mínimo y máximo.

En cuanto a la cuantificación de marcadores inflamatorios solubles en relación a la presencia de síndrome metabólico, observamos que las pacientes con síndrome metabólico presentaban mayores concentraciones de IL-8 y de ICAM-1 y menores concentraciones de IFN $\alpha$ , TNF, IFN $\gamma$ , según se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Concentraciones de marcadores inflamatorios solubles en las pacientes con y sin síndrome metabólico (SM)

Variable (pg/ml)	Pacientes con SM (N=13)	Pacientes sin SM (N=33)	p
IL-8	16,8 ± 8,8	11,5 ± 5,6	<b>0,01</b>
IFN $\alpha$	1,6 ± 1,7	3,4 ± 3,4	<b>0,03</b>
TNF	0,3 ± 0,6	1,5 ± 1,7	<b>0,01</b>
IFN $\gamma$	1,09 ± 2,0	2,8 ± 7,1	<b>0,04</b>
IL-6	5,2 ± 4,5	3,4 ± 2,6	NS
VEGF	102,4 ± 70,5	118,1 ± 99,1	NS
MCP-1	204,8 ± 266,2	183,3 ± 424,1	NS
ET-1	787,3 ± 1084,1	717,6 ± 1702,2	NS
IL-10	33,6 ± 104,1	12,5 ± 40,1	NS
E-selectina	4504,8 ± 2755,4	4075,7 ± 2855,8	NS
ICAM-1	159,8 ± 98,1	123,1 ± 183,6	<b>0,01</b>
VCAM-1	106,8 ± 20,6	97,5 ± 21,4	NS

IL-8: Interleucina 8. IFN $\alpha$ : Interferón alfa. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN  $\gamma$ : Interferon gamma. IL-6: interleucina 6. VEGF: factor de crecimiento endotelial. MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1. ET-1: Endotelina 1. IL-10: Interleucina 10. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular.

## 5.2 Relación entre las concentraciones de CPE, células endoteliales apoptóticas y marcadores inflamatorios solubles según puntuación en los índices de actividad y de daño orgánico

Se dividió a las pacientes en dos grupos, con enfermedad activa e inactiva, teniendo en cuenta el índice SLEDAI y se cuantificó la concentración de células. No se

observaron diferencias en cuanto al porcentaje de CPE entre las pacientes inactivas ( $\text{SLEDAI} \leq 4$ ) y las pacientes con enfermedad activa ( $\text{SLEDAI} > 4$ ). Tampoco se encontraron diferencias entre las células endoteliales apoptóticas.

En cuanto al índice de daño orgánico acumulado no se observó diferencia en la concentración de CPE entre las pacientes con daño orgánico ( $\text{SLICC/ACR} > 0$ ) o sin él ( $\text{SLICC} = 0$ ).

Se realizaron correlaciones entre los distintos marcadores inflamatorios solubles y los valores del SLEDAI y SLICC/ACR, hallándose correlación significativa entre el SLEDAI y la IL-6 ( $r=0,37$ ;  $p=0,01$ ) y entre el SLICC/ACR y moléculas inflamatorias como la IL-8 ( $r=0,37$ ;  $p=0,01$ ), la IL-6 ( $r=0,36$ ;  $p=0,01$ ), la MCP-1 ( $r=0,43$ ;  $p=0,002$ ) y la ET-1 ( $r=0,4$ ;  $p=0,005$ ).

### 5.3 Relación entre las concentraciones de CPEs, células endoteliales apoptóticas y marcadores inflamatorios solubles con los diferentes tratamientos

Se realizó un análisis en busca de diferencias en la concentración de CPE según el tratamiento que hubiesen realizado las pacientes en los últimos 3 meses, que se consideró el tratamiento actual.

No se encontraron diferencias en la concentración de CPE entre las pacientes tratadas y las no tratadas y tampoco cuando se realizó el análisis entre los diferentes tratamientos.

Tampoco encontramos diferencias en la concentración de CPE teniendo en cuenta el tratamiento que hubiesen realizado las pacientes a lo largo de toda la historia de evolución de la enfermedad.

No hubo diferencias en la concentración de CPE entre aquellas pacientes con estatinas y sin estatinas.

En relación a los factores solubles, se encontraron diferencias significativas en la concentración de IFN $\gamma$  entre las pacientes sin tratar y aquellas con algún tratamiento ( $2,2 \pm 2,1$  vs  $2,4 \pm 6,7$ ;  $p=0,03$ ).

Cuando analizamos las diferencias entre los diferentes tratamientos encontramos diferencias en la concentración de INF $\alpha$ , IL-6 y endotelina-1. Las pacientes en tratamiento con antimaláricos e inmunosupresores tienen concentraciones más elevadas de éstos factores que las pacientes en tratamiento sólo con antimaláricos (Tabla 20).

Tabla 20. Concentraciones de marcadores inflamatorios solubles en pacientes con tratamiento con antimaláricos y pacientes con antimaláricos e inmunosupresores.

	<b>Antimaláricos + Inmunosupresores</b>	<b>Antimaláricos</b>
INF $\alpha$	$3,9 \pm 3,7$	$1,3 \pm ,5$
IL-6	$4,4 \pm 3,1$	$3,5 \pm 4,3$
ET-1	$926,7 \pm 2614,8$	$776,1 \pm 858,3$

INF $\alpha$ : Interferón alfa. IL-6: interleucina 6. ET-1: Endotelina 1.

## *Discusión*

Durante años, el LES estuvo considerado como una enfermedad mortal, debido a que la mayoría de los pacientes que lo sufrían fallecían por alguna complicación derivada de la propia enfermedad. En la década de los 70 aparecieron las primeras publicaciones que demostraban que a medida que la enfermedad era controlada por los distintos tratamientos y mejoraba el pronóstico de la misma, los pacientes morían de complicaciones tardías cardiovasculares (Urowitz M, 1976; Rubin LA, 1985). Fue entonces cuando se comenzó a estudiar la especial vulnerabilidad del sistema cardiovascular de estos pacientes y se observó que el proceso de aterogénesis acelerada no se podía explicar sólo con una mayor frecuencia de los factores de riesgo clásicos y que la propia enfermedad lúpica tenía un peso fundamental (Esdaile JM, 2001).

A partir de estos datos, se comenzó a buscar la manera de detectar de forma precoz la arteriosclerosis por diferentes métodos como fueron, el estudio ecográfico de la placa carotídea (Manzi S, 1997; Roman M, 2003), la calcificación coronaria por tomografía (Asanuma Y, 2003), la medida del ITB (Theodoridou A, 2003), la cuantificación del GIM (Wolak T, 2004; Selzer F, 2004) la disfunción endotelial (El-Magadmi M, 2004) y más recientemente, la medida de la VOP, definida como el “gold standard” para la medida de elasticidad arterial (Tso TK, 2005; Bjarnegård N, 2006; Shang Q, 2008; Sabio JM, 2009; Cacciapaglia F, 2009).

Por otro lado, se comprobó en la población general que la anormal función del endotelio tenía relación con el desarrollo de arteriosclerosis (Schachinger V, 2000) y en 2004 se empezó a valorar el papel del daño y la apoptosis de las células endoteliales en el desarrollo de disfunción vascular en el LES y más tarde el significado de las células progenitoras endoteliales circulantes (Rajogopalan S, 2004).

En este trabajo que toma como referencia la medida de la elasticidad arterial mediante la VOP, se ha evaluado la relación existente entre la VOP con los diferentes factores de riesgo clásicos y propios de la enfermedad y fundamentalmente con la concentración de las células progenitoras endoteliales, células endoteliales apoptóticas y de distintos marcadores de inflamación.

Además se realizaron las mediciones de la placa carotídea y del GIM, empleadas más frecuentemente como medida de arteriosclerosis en trabajos anteriores donde evaluaban y analizaban su relación, fundamentalmente, con los factores de riesgo cardiovascular clásicos y de forma menos concluyente con factores relacionados con el LES. En nuestro trabajo nos hemos centrado en la relación de estos parámetros con las células progenitoras endoteliales, células endoteliales apoptóticas y los marcadores inflamatorios.

Hemos observado la buena correlación existente entre la medida del GIM y de la VOP, considerándolas como instrumentos de detección del mismo proceso patológico en diferente estado evolutivo.

Así, simplificando el mecanismo de formación de arteriosclerosis, podríamos explicarlo como, en primer lugar, una disfunción endotelial y pérdida de elasticidad arterial medible con la VOP, después un engrosamiento de la pared del vaso, detectable mediante el GIM y por último la formación de la placa, visible mediante ecografía carotídea (Tziomalos K, 2008; Zardi EM, 2010).



### Características de la población incluida en el estudio

De los resultados obtenidos en el análisis descriptivo podemos destacar que las pacientes del estudio tienen una edad similar a la de otros trabajos con pacientes con LES (Selzer F 2001; Tso TK 2005; Shang Q 2008; Sabio JM, 2009). También se puede concluir que no tienen mayor prevalencia de factores de riesgo clásicos que los mostrados en otros estudios, de hecho, tienen menos prevalencia de algunos de ellos, como de hipertensión arterial o de hábito tabáquico (Petri M, 1992). En cuanto al síndrome metabólico, factor de riesgo en el que últimamente algunos autores han mostrado especial interés, existen similares porcentajes de incidencia (Sabio JM, 2009). Tampoco existe en nuestra muestra una alta prevalencia de enfermedad renal, factor de riesgo fundamental en la génesis de la enfermedad arteriosclerótica.

Por tanto, es una población en la que no existe una alta prevalencia de estos factores, seguramente porque se trata de pacientes mayoritariamente jóvenes, por lo que es una muestra que en principio no debiera tener un riesgo cardiovascular elevado, como así lo demuestra el Heart Score calculado para cada una de ellas.

En nuestra muestra hay siete pacientes que presentaban enfermedad cardiovascular en el momento del estudio, lo que significa un 15% del total. Hay que destacar que de las siete pacientes, tres tenían síndrome antifosfolípido por lo que, seguramente, el evento cerebrovascular que sufrieron no se debió a una placa arteriosclerótica sino a un fenómeno embólico. Sólo una paciente (2,1%) presentaba enfermedad coronaria. En los trabajos publicados, la incidencia de enfermedad coronaria arterial se cifra entre un 6-15% (Urowitz M, 1976; Gladman D, 1987; Petri M, 1992; Manzi S, 1997) y en el trabajo de Urowitz *et al*, con una cohorte de más de 1000 pacientes, se hallaron incidencias similares a las nuestras (Urowitz M, 2007).

En cuanto al LES, la mayoría de nuestras pacientes se encontraban en fase inactiva de su enfermedad. Ningún paciente sobrepasaba un SLICC/ACR mayor de 6 e incluso el 30% tenía un SLICC/ACR igual a 0. En cuanto al tratamiento de las pacientes, los distintos regímenes se basaban, como es habitual, en la combinación de antimaláricos, corticoides y en un número menor de casos, inmunosupresores. También había pacientes que no habían recibido ningún tratamiento de los descritos.

### **Relación entre velocidad onda de pulso y factores de riesgo clásicos**

Nuestros resultados muestran que existe una relación estrecha de la VOP con la edad y la PA. Esta asociación parece lógica ya que la edad es el mayor contribuyente a la pérdida de elasticidad arterial y la PA aparece constantemente relacionada con la VOP en los diferentes estudios (Mitchell GF, 2004). Por este motivo, en nuestro estudio, los resultados de la VOP se han ajustado a la edad y a la PA con el propósito de eliminar estos factores tan íntimamente relacionados y así poder analizar otras asociaciones. En estudios anteriores, no se tuvieron en cuenta estos parámetros, lo que provoca una limitación a la hora de interpretar los resultados (Sabio JM, 2009; Tso TK, 2005).

En nuestro trabajo encontramos que la rigidez arterial estaba asociada a los niveles de homocisteína, PCRas, ácido úrico y a la presencia de hipertrigliceridemia y síndrome metabólico. En trabajos previos se encontraron asociaciones que en ocasiones coinciden, así en el trabajo de Tso *et al* se observa relación con los niveles de glucosa y de homocisteína (Tso TK, 2005), en el trabajo de Selzer *et al* con la obesidad y con los niveles de creatinina en pacientes postmenopáusicas (Selzer F, 2001) y en el trabajo de Sabio *et al* con niveles de PCR y con la presencia de síndrome metabólico (Sabio JM, 2009).

La homocisteinemia es una condición patológica caracterizada por un incremento en la concentración total de homocisteína y ha sido sugerida como factor independiente de arteriosclerosis y trombosis en la población general (Clarke R, 1991) y en los pacientes con LES (Petri M, 1996). Ya en el trabajo de Von Feldt *et al*, los niveles de homocisteína eran más elevados en los pacientes con calcificación coronaria (Von Feldt, 2006) y Roman *et al* lo relacionaron con la mayor prevalencia de placa carotídea (Roman M, 2007). En el trabajo de Tso *et al* encontraron una correlación positiva entre los niveles de homocisteína y la VOP y también encontraron que aquellas pacientes con una VOP por encima de 14 m/s tenían cifras más elevadas que aquellas con VOP por debajo de ese nivel (Tso TK, 2006). Nuestros resultados revelan que las pacientes con una VOP patológica tienen cifras más elevadas de homocisteína en plasma, lo que sugiere que la hiperhomocisteinemia podría estar involucrada en la pérdida de elasticidad arterial en pacientes con LES.

Los niveles elevados de PCRas se asocian a mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y esto se debe a su papel en el proceso de aterogénesis. Se utiliza como marcador precoz de riesgo cardiovascular y parece tener un papel predictivo en el proceso de inflamación del endotelio vascular. La PCRas está asociada a daño orgánico en el LES y se ha propuesto como útil en la identificación de pacientes de riesgo (Lee S, 2008). En nuestro trabajo, las cifras elevadas de PCRas se han asociado a mayor rigidez arterial y esto puede indicar que existe un incremento de la inflamación a nivel vascular. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Sabio *et al* (Sabio JM, 2009) y con otro estudio en el que también correlacionan los niveles de PCR con la rigidez arterial en pacientes con LES y artritis reumatoide (Langenberg C, 2006).

En el análisis de los datos, se obtuvo también que la VOP se relacionaba con los niveles de ácido úrico. En la literatura se ha mencionado la unión existente entre el ácido úrico y una gran variedad de patología cardiovascular, como la hipertensión (Krishnan E, 2007), el síndrome metabólico (Ford ES, 2007), la enfermedad coronaria (Tuttle KR, 2001) y el ictus (Lehto S, 1998). Aunque la hiperuricemia no es un hallazgo frecuente en el LES, existen trabajos que lo relacionan como factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular en la artritis reumatoide (Panoulas VF, 2007) y se ha correlacionado con la arteriosclerosis subclínica en pacientes con artritis psoriásica (Gonzalez-Gay MA, 2008). Sabio *et al* hallaron resultados similares a los nuestros aunque en este trabajo, la VOP se dividió en cuartiles y no se ajustó por edad ni por PA (Sabio JM, 2010). Es difícil establecer si el ácido úrico se correlaciona de forma independiente con la elasticidad arterial ya que frecuentemente está asociado a otros factores de riesgo tales como la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia, la obesidad, el síndrome metabólico o la insuficiencia renal crónica.

En cuanto a la hipertrigliceridemia, existen trabajos que lo relacionan con la existencia de placa carotídea (Telles RW, 2008). Otros trabajos realzan su papel en la génesis de la lesión arteriosclerótica y se apoyan en la relación que encuentran entre la cifra elevada de TG y algunos factores proinflamatorios como el TNF $\alpha$  (Svenungsson E, 2003). En nuestro trabajo, las pacientes con hipertrigliceridemia tienen mayor rigidez arterial, lo que ya se ha visto en otras poblaciones diferentes a LES y que está muy en relación con el síndrome metabólico y con la diabetes.

El síndrome metabólico es una condición clínica que agrupa varios factores de riesgo cardiovasculares y se ha reconocido como predictor independiente de morbilidad y mortalidad cardiovascular, especialmente en mujeres (Iglseder B, 2005). Varios estudios han mostrado la asociación existente entre el SM y la elasticidad

arterial (Safar ME, 2006). Uno de los hallazgos importantes en nuestro trabajo fue que al realizar el análisis multivariante para buscar aquellos factores relacionados de manera independiente con la rigidez arterial, encontramos una relación muy estrecha entre la VOP y el SM (OR 6,6; IC 95% 1,2 – 38). Estos resultados significan que una paciente con LES y SM tiene 6,6 veces más riesgo de tener una VOP patológica que una paciente con LES pero sin SM, lo que apoya la idea de que el SM podría contribuir al desarrollo de arteriosclerosis en este tipo de pacientes. En el trabajo de Sabio *et al* encuentran también una relación estrecha entre la elasticidad arterial y el SM con una OR algo menor que la de nuestro estudio (Sabio JM, 2009).

### **Relación entre velocidad onda de pulso y factores de riesgo relacionados con el LES**

La VOP no se relacionó en nuestro trabajo con el SLEDAI. Este resultado es esperable si tenemos en cuenta que el SLEDAI valora la actividad de la enfermedad en un momento puntual y la pérdida de elasticidad arterial es el resultado del efecto prolongado de los factores de riesgo cardiovasculares y del LES en sí mismo.

Sin embargo y según nuestros resultados, existe una relación estrecha entre la VOP y el SLICC/ACR o índice de daño acumulado ( $p=0,006$ ), incluso al realizar el análisis multivariante, el SLICC/ACR se asoció de forma independiente al aumento de la VOP. Ya existían estudios que habían encontrado resultados similares relacionando SLICC/ACR con la placa carotídea (Roman M, 2003; Maksimowickz-McKinnon K, 2006), con alteraciones en angiografía coronaria (Sella E, 2003), con aumento del GIM (Manzi S, 1999) e incluso con la VOP (Selzer F, 2001; Shang Q, 2008; Sabio JM, 2009). El SLICC/ACR es un sistema de puntuación que incluye variables que evalúan la afectación cardiovascular. En un primer análisis de nuestro estudio no se excluyeron a las pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, lo que podría llevar a

resultados con sesgos, por lo que se decidió realizar también el análisis excluyendo a estas pacientes para evitar ese posible factor de confusión y se volvió a encontrar asociación significativa ( $p=0,039$ ).

Esta asociación podría deberse a que las pacientes con mayor daño orgánico tienen más años de evolución, pero también puede ser debido a una mayor agresividad de la enfermedad con más inflamación y una persistente disfunción inmunológica que favorece el desarrollo de alteraciones en la pared vascular.

### **Relación entre la velocidad onda de pulso y tratamientos**

No encontramos que los diferentes tratamientos, tanto el previo como el que estaban recibiendo en el momento del estudio, influyeran en los resultados de la VOP. En la literatura, el papel de los diferentes tratamientos en la génesis de arteriosclerosis es controvertido y algunos autores definen la toma de corticoides como factor de riesgo (Bessant R, 2006; Karp I, 2008) y otros sin embargo, como factor protector, por controlar de forma más estricta los mecanismos de inflamación (Roman M, 2003). Selzer *et al* encontraron una asociación significativa entre la ausencia de tratamiento con antimaláricos y el incremento en la VOP en mujeres premenopáusicas (Selzer F, 2001) y Sabio *et al* encontraron una tendencia similar pero sin significación estadística (Sabio JM, 2009). Previamente, Roman *et al* publicaron que el tratamiento con hidroxicloroquina estaba asociado con menor presencia de placa carotídea en LES (Roman M, 2003). Estos hallazgos sugieren que los antimaláricos podrían tener algún efecto beneficioso sobre la pared del vaso que con nuestros datos no se puede concluir.

## **Células progenitoras endoteliales, células endoteliales apoptóticas y medidas de arteriosclerosis subclínica**

Desde hace algunos años, se ha descrito que las CPE juegan un papel importante en la reparación y regeneración endotelial por lo que se han definido como reguladoras de la integridad cardiovascular (Jia L, 2006). Se ha encontrado una disminución en el número y una alteración en las funciones de las CPE en la patogénesis de la arteriosclerosis.

Recientemente se ha comenzado a estudiar y determinar el papel de las CPE en las enfermedades reumatológicas y en el LES concretamente existen algunos trabajos que encuentran que las CPE están disminuidas respecto a controles sanos (Denny MF, 2007; Moonen JR, 2007; Westerweel PE, 2007; Lee PY, 2007). Aunque no en todos estos estudios se determinan la CPE que expresa los tres marcadores característicos (CD34+KDR+CD133+) y el método de cuantificación no es homogéneo, todos coinciden en afirmar que los pacientes con LES muestran menos CPE que los sanos incluso en periodos de inactividad de la enfermedad. Algunos de los autores concluyen que esta disminución en el número de CPE es debido a una mayor apoptosis de la célula endotelial hematopoyética (Westerweel PE, 2007; Moonen JR, 2007) y otros que esta apoptosis está inducida por las grandes cantidades de INF $\alpha$  que existen en estos pacientes (Denny MF, 2007; Lee PY, 2007). Apoyando esta hipótesis, existen trabajos que afirman que esta mayor susceptibilidad de la CPE a la apoptosis se debe a la falta de expresión de proteínas reguladoras de la muerte celular programada (Moonen JR, 2007). Otros autores no encuentran estas diferencias entre los pacientes con LES y los controles y buscan alteración en la funcionalidad de las CPE. Hallan alteración en la adhesión (Grisar J, 2008; Deng XL, 2009; Ablin JN, 2010) y la capacidad de migración (Moonen JR, 2007; Grisar J, 2008; Deng XL, 2009) de las CPE en los LES respecto a los controles.

Por último, otros analizan las concentraciones de células endoteliales apoptóticas y comprueban que los pacientes con LES tienen más cantidad que los controles sanos (Westerweel PE, 2007) y que incluso pacientes con enfermedad coronaria (Rajagopalan S, 2004). En nuestro trabajo se encontró una tendencia en este sentido aunque sin significación estadística.

Las diferencias en la cuantificación de las CPE entre los diferentes autores podrían explicarse por el uso de diferentes marcadores de superficie a la hora de identificar a las CPE, por la diferente prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular y la distinta medicación de los pacientes o por las diferencias en la media de duración de la enfermedad y la actividad de la misma. Algunos de estos factores han sido relacionados con el número de las CPE en otras enfermedades autoinmunes (Avouac J, 2008; Del Papa N, 2008).

El procedimiento por el que se cuantificaron las CPE en nuestro estudio es similar al recomendado por la European League Against Rheumatism Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) publicado en 2009 (Distler J, 2009).

En nuestro trabajo no se compara la concentración de CPE de pacientes con LES y controles, sino que en una muestra de pacientes con LES se intenta correlacionar las CPE con una medida de disfunción endotelial como es la medida de la rigidez arterial mediante la **velocidad de onda de pulso**. En el análisis de los datos encontramos que las pacientes con la VOP patológica tenían menos CPE que las pacientes con una VOP normal, esto es, que a menos CPE mayor rigidez arterial. Esta asociación la encontramos con todas las CPE sea cual sea su estado de maduración e incluso con las CPE triples positivas, no determinadas por otros autores. Esta tendencia aparece también con las células progenitoras hematopoyéticas CD34+,



aunque sin significación estadística. Westerweel *et al* encontraron igualmente una relación negativa entre la elasticidad arterial y las CPE (Westerweel PE, 2007).

La asociación entre las CPE y la VOP encontrada en nuestro estudio, avala la hipótesis realizada por otros autores, de que los niveles de CPE se correlacionan positivamente con la función endotelial en la población general (Hill JM, 2003) y apoya la idea de que niveles bajos de CPE podrían ser predictores de eventos cardiovasculares en pacientes con LES como lo son en pacientes no lúpicos con enfermedad coronaria. (Werner N, 2005).

A la vista de nuestros resultados, sugerimos que los pacientes con LES ante la elevada demanda de regeneración endotelial, no son capaces de reparar el daño vascular por tener un menor número de CPE.

Por otro lado, a todas las pacientes del estudio se les midió el **grosor íntima-media** como parámetro de arteriosclerosis subclínica. Revisando la literatura, no existe un punto de corte claramente establecido para definir un GIM normal o patológico. En nuestro caso, se utilizó como punto de corte 0,55mm por ser la mediana de nuestra muestra y porque así lo defienden algunos autores que refieren, en población no lúpica, una sensibilidad del 96% y un valor predictivo negativo del 98% para el diagnóstico de enfermedad cardiovascular (Belhassen L, 2002).

Cuando se analizó la asociación del GIM con las células progenitoras endoteliales, no se encontraron diferencias con significación estadística. Sin embargo si se encontró que las pacientes con un GIM  $\geq 0,55$ mm tenían más concentración de células endoteliales apoptóticas que las pacientes con un GIM  $< 0,55$ mm. Como se ha descrito anteriormente en la literatura, las pacientes con LES tienen más células endoteliales apoptóticas que los controles sanos (Rajogopalan S, 2004; Elshal M,

2009) e incluso se ha afirmado que este incremento se correlaciona con una función endotelial alterada medida por dilatación mediada por flujo (DMF) y tras estímulo con nitratos (Rajogopalan S, 2004). Con nuestros resultados llegamos a una conclusión similar, las pacientes con un GIM alterado tienen más células endoteliales apoptóticas circulantes.

En concordancia con nuestros resultados en relación a la VOP, las pacientes con un GIM mayor deberían tener menos CPE, pero nosotros no encontramos diferencias. Esto puede deberse a que el GIM medio de nuestra muestra no era muy patológico. Existen autores que teniendo en cuenta la literatura al respecto, afirman que el GIM de las pacientes con LES no es muy diferente al de los controles sanos y, por tanto, que no es una medida que refleje adecuadamente el daño endotelial de los pacientes con esta enfermedad (Zardi EM, 2010).

En cuanto a la relación entre la presencia o no de **placa carotídea** en las pacientes de la muestra y las células progenitoras endoteliales no se encontraron diferencias. Tan sólo se observa una tendencia que va en consonancia a lo encontrado en la relación de las CPE y la VOP, las pacientes con placa tienen menos CPE que las pacientes sin placa. Tampoco encontramos diferencias en cuanto a la cantidad de células endoteliales apoptóticas circulantes.

Las causas de no encontrar asociación entre las CPE, las células endoteliales apoptóticas y la placa podrían deberse a que sólo 9 pacientes de nuestra muestra tenían placa al realizar la ecografía carotídea, número insuficiente para hallar significación estadística.

## **Marcadores inflamatorios solubles y medidas de arteriosclerosis subclínica**

Numerosos marcadores de inflamación han sido asociados con el riesgo cardiovascular, esto se debe a que el desarrollo de arteriosclerosis comienza cuando las células inflamatorias, como los linfocitos T y los monocitos, son reclutados dentro del endotelio. En este proceso intervienen moléculas de adhesión que a su vez están reguladas por citocinas inflamatorias.

Muchos estudios han concluido que algunos de estos mediadores inflamatorios se encuentran incrementados en pacientes con LES respecto a controles (Asanuma Y, 2006; Studnicka-Benke A, 1996; Svenungsson E, 2003; Kuryliszyn-Moskal A, 2008).

En estudios previos se ha intentado correlacionar la concentración de éstas moléculas con otras medidas de arteriosclerosis, por ejemplo, la presencia de calcificación coronaria con los niveles de IL-6, de MCP-1 (Asanuma Y, 2006), de ICAM-1 (Kao AH, 2008) de E-selectina y de VCAM-1 (Rho YH, 2008). Otros encontraron asociación entre los niveles de E-selectina y la presencia de placa carotídea (Reynolds HR, 2010). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre las moléculas VCAM-1 e ICAM-1 y la presencia o ausencia de placa carotídea (Roman M, 2003).

En nuestro estudio, hemos encontrado asociación entre la rigidez arterial y algunas citocinas inflamatorias como la IL-8 que también se asociaba a la presencia de placa. También hallamos que las moléculas de adhesión tales como E-selectina e ICAM-1 estaban asociadas con el GIM y con la placa respectivamente. Se ha descrito que estas moléculas de adhesión son detectables tras un daño endotelial lo que apoya, para algunos autores, la idea de su papel precoz en el proceso de aterogénesis (Wu JT, 2005).

A la luz de nuestros resultados, aunque parece que algunas citocinas y moléculas de adhesión están asociadas a daño vascular, creemos no son del todo concluyentes como para utilizarlos como marcadores predictivos de arteriosclerosis subclínica en pacientes con LES.

### **Relación entre células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas con factores de riesgo cardiovascular**

La asociación entre las CPE y los factores de riesgo clásicos ha sido ampliamente estudiada en población general y sobre todo en pacientes con enfermedad cardiovascular. En ellos, se ha demostrado una relación entre la presencia de factores de riesgo y concentraciones bajas de CPE. Así, existen trabajos que relacionan la presencia de HTA (Oliveras A, 2008) y de DM (Umemura T, 2008) con el descenso en las CPE, incluso con la pérdida de la capacidad de migración de las CPE (Vasa M, 2001). También hay autores que relacionan el tabaco como factor independiente asociado a la pérdida de CPE (Vasa M, 2001) e incluso la enfermedad renal (Choi JH, 2004).

Respecto a los pacientes con LES, pocos autores estudian la relación de las CPE con los factores cardiovasculares clásicos. Denny *et al* no encontraron asociación con la enfermedad renal ni con los niveles bajos de HDL-col, niveles altos de LDL-col, homocisteína, diabetes o tabaco. En su discusión, explican estos resultados por la baja prevalencia de los factores de riesgo en su muestra (Denny MF, 2007). Grisar *et al* tampoco encontraron asociación entre las CPE y la HTA, diabetes o tabaco (Grisar J, 2008).

En nuestros resultados, sí podemos observar que la cifra de CPE varía de forma significativa dependiendo de la presencia o ausencia de determinados factores de riesgo conocidos, lo que estaría de acuerdo con los trabajos anteriormente citados sobre la población general. Así, encontramos que las pacientes fumadoras tenían menos CPE que las que no fumaban al igual que las pacientes con HTA y las que presentaban una glucemia alterada en ayunas. Las pacientes con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz tenían menos células progenitoras hematopoyéticas que aquellas sin antecedentes familiares. No encontramos diferencias en cuanto a las células endoteliales apoptóticas.

En cuanto a los factores de riesgo no clásicos, encontramos una correlación inversa entre los niveles de PCRas y las CPE. Las pacientes con mayor inflamación tienen menos CPE, debido probablemente al papel de esta proteína en la inflamación.

Hemos querido separar, a la hora de exponer los resultados, la asociación de las CPE con la presencia de síndrome metabólico, por ser actualmente un factor de riesgo importante para ECV. Nuestro trabajo demuestra, por primera vez, que las pacientes lúpicas con síndrome metabólico tienen menos CPE que las que no presentan este síndrome. Este resultado sigue en consonancia con los dicho anteriormente y con la literatura en población no lúpica (Jialal I, 2010).

### **Relación entre células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas con factores de riesgo de LES**

Muchos trabajos que cuantifican las CPE en pacientes con LES, intentan relacionarlas con factores como la duración y actividad de la enfermedad, con las cifras del complemento y con la presencia de los diferentes autoanticuerpos. Existe disparidad en los resultados que relacionan el SLEDAI con las CPE. Hay autores que

encuentran esa relación (Denny MF, 2007) y otros, al igual que en nuestro trabajo, no la encuentran (Westerweel PE, 2007; Moonen JR, 2007; Deng XL, 2009; Ablin JN, 2010). Otros autores analizan la relación existente entre los niveles del complemento y autoanticuerpos sin que nos sea posible llegar a una conclusión clara por la diferencia en los resultados (Moonen JR, 2007; Robak E, 2009; Deng XL, 2009).

Más homogéneos en sus resultados son los estudios que analizan la relación entre las células endoteliales circulantes (en apoptosis o no) y el SLEDAI. La mayoría de ellos llegan a la conclusión que los pacientes con mayor actividad tienen más células endoteliales circulantes (Clancy R, 2001; Rajogopalan S, 2004; Elshal M, 2009). En nuestro trabajo no se encontró esa asociación, quizás por el número escaso de pacientes con enfermedad activa (n=7).

Tampoco encontramos diferencias en relación al SLICC/ACR, lo que podría explicarse de igual modo, por el escaso número de pacientes con un SLICC/ACR elevado.

### **Relación entre células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas con los tratamientos**

Cuando se ha intentado relacionar las CPE y los distintos tratamientos de la enfermedad de LES, se han encontrado resultados dispares. La mayoría de los trabajos, al igual que el nuestro, no encuentran asociación con ningún tratamiento (Clancy R, 2001; Denny MF, 2007; Moonen JR, 2007; Robak E, 2009).

Estudios previos en artritis reumatoide, habían observado asociación entre el uso de corticoides y un aumento en las cifras de CPE (Grisar J, 2007). En pacientes con LES, el uso de corticoides se ha asociado a disminución de las cifras de células endoteliales circulantes, pero no a disminución o incremento de CPE (Elshal M, 2009).

Resultados similares aparecen si revisamos los estudios que analizan la concentración de CPE y la toma de antimaláricos. Westerweel *et al* afirmaron que el uso de hidroxicloroquina se asocia a concentraciones mayores de CPE y parece que el efecto es dosis dependiente (Westerweel PE, 2007). Este hallazgo podría explicarse por el efecto beneficioso de los antimaláricos en el perfil lipídico de los pacientes con LES. Sin embargo, Grisar *et al* mostraron un efecto negativo de los antimaláricos, reduciendo los niveles de CPE aunque ellos mismos indican que el número de pacientes de su estudio era muy pequeño y quizás por este motivo, no encuentren diferencias (Grisar J, 2008).

Existen estudios en población distinta de LES en los que se ha observado que la toma de estatinas podría aumentar la concentración de CPE (Spadaccio C, 2010; Jaumdally RJ, 2010); incluso este hallazgo también se ha observado en estudios de pacientes con otras enfermedades inflamatorias como la esclerosis sistémica (Kuwana M, 2009). En nuestros resultados no se observa una diferencia entre las pacientes que están en tratamiento con estatinas y las que no. Se necesitarían estudios prospectivos que analizaran el impacto de esta medicación sobre la concentración de CPE.

A la vista de nuestros resultados y los de los estudios previos, podríamos concluir que, actualmente, no existe ningún tratamiento que haya demostrado algún potencial beneficio en cuanto al incremento de las CPE.

### **Relación entre los marcadores inflamatorios solubles y factores de riesgo clásicos, relacionados con el LES y tratamientos**

Como ya se expuso anteriormente, en la cascada de la inflamación intervienen numerosas citocinas y moléculas de adhesión. Es por tanto, normal, que tanto en la

arteriosclerosis como en el LES, al ser enfermedades donde la inflamación juega un papel primordial, los niveles de estos marcadores estén incrementados.

Así, todo aquello que incremente el riesgo de arteriosclerosis, como son los factores de riesgo cardiovascular clásicos, puede aumentar la concentración de marcadores inflamatorios. En nuestro trabajo, encontramos asociación entre la presencia de HTA, hipertrigliceridemia y síndrome metabólico con aumento en la concentración de citocinas inflamatorias tipo IL-8, INF $\gamma$  y moléculas de adhesión como la VCAM-1. Similares hallazgos se han encontrado en trabajos previos donde relacionan concentraciones elevadas de las citocinas inflamatorias con marcadores de inflamación como la PCRas y el fibrinógeno (Hansson GK, 2005) y con la homocisteína (Mc Mahon M, 2007); hallazgos que también hemos observado en nuestros resultados.

Del mismo modo, en el LES activo y en el LES con mayor daño crónico a lo largo de la evolución de la enfermedad, esperaríamos encontrar altas concentraciones de estos marcadores. En nuestro trabajo, esto lo observamos al analizar los resultados de las correlaciones entre los mediadores inflamatorios y los índices SLEDAI y SLICC/ACR; los dos se asocian a niveles incrementados de citocinas inflamatorias (IL-8, IL-6) y moléculas responsables de la migración de los monocitos a la pared vascular (MCP-1).

En cuanto a la relación entre los factores solubles y los tratamientos, encontramos que las pacientes en tratamiento con antimaláricos e inmunosupresores mostraban concentraciones más elevadas de INF $\alpha$ , IL-6 y ET-1 que las pacientes con sólo antimaláricos. Este resultado puede ser debido a que las pacientes que precisan tratamiento con inmunosupresores suelen tener enfermedad más activa y por tanto no es de extrañar que tengan mayores concentraciones de marcadores inflamatorios.



En resumen, algunos de nuestros hallazgos coinciden con lo referido por otros autores, pero no es posible llegar a la conclusión de que un marcador inflamatorio soluble concreto pueda ser de utilidad para establecer el pronóstico y la respuesta al tratamiento de las pacientes con LES.

### **Limitaciones del estudio**

Este trabajo de investigación tiene algunas limitaciones que deben ser consideradas. La primera es que el número de pacientes que pudieron incluirse fue limitado. Segundo, que el propio diseño del estudio constituye una limitación al tratarse de un estudio trasversal basado en una medida puntual de la VOP y una determinación única de CPE y demás marcadores inflamatorios, aunque la mayoría de los estudios que investigan los mecanismos de la arteriosclerosis acelerada en el LES tienen el mismo diseño. Y tercero, que para el análisis de los datos, se han incluido pacientes con enfermedad cardiovascular establecida aunque para algunos resultados, finalmente fueron excluidos.

*Como resultado de mayor interés de este trabajo de investigación, queremos destacar que las **células progenitoras endoteliales podrían suponer un nuevo marcador** para la detección precoz de arteriosclerosis subclínica. Serían necesarios estudios prospectivos encaminados a determinar el papel definitivo de las CPE y buscar algún posible tratamiento dirigido a evitar su pérdida o aumentar su número así como evaluar el efecto que ello tendría sobre la función vascular.*

## *Conclusiones*

De los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se deducen las siguientes conclusiones:

1. Existe relación entre la velocidad onda de pulso y el porcentaje de células progenitoras endoteliales. Los pacientes con mayor rigidez arterial presentan una menor concentración de células progenitoras endoteliales. Por tanto, las CPE podrían constituir un nuevo marcador para la detección precoz de arteriosclerosis subclínica en el LES. No se encontraron diferencias significativas con el grosor íntima-media ni con la presencia de placa carotídea.

2. Las pacientes con mayor grosor intima-media tenían un porcentaje más elevado de células endoteliales apoptóticas, pero este porcentaje no se relacionó con la velocidad onda de pulso ni con la presencia de placa carotídea.

3. Se encontró relación entre la velocidad onda de pulso, el grosor íntima-media y la presencia de placa carotídea con concentraciones elevadas de algunos marcadores inflamatorios, pero no podemos establecer una clara asociación que nos permita utilizarlos como marcadores de arteriosclerosis subclínica.

4. Los pacientes con concentraciones elevadas de PCRs, homocisteína, ácido úrico, triglicéridos y los que cumplían criterios de síndrome metabólico, presentaban mayor rigidez arterial medida por velocidad onda de pulso. El síndrome metabólico se asoció de forma independiente en el análisis multivariante a la pérdida de elasticidad arterial.

5. El índice de daño acumulado (SLICC/ACR) se asoció de manera independiente a la pérdida de elasticidad arterial. No se encontró diferencias en la velocidad onda de pulso entre los diferentes tratamientos.

6. La concentración de células progenitoras endoteliales disminuye de forma significativa con la presencia de HTA, tabaco, glucemia elevada en ayunas e historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz, así como con el aumento de la PCRas y niveles de fibrinógeno. Se ha comprobado que la presencia de síndrome metabólico se asocia a concentraciones menores de células progenitoras endoteliales, hallazgo no descrito previamente en la literatura. Ninguno de estos factores se relacionó con las células endoteliales apoptóticas.

7. No se encontró relación entre la concentración de células progenitoras endoteliales y células endoteliales apoptóticas con los factores relacionados con el LES ni con los diferentes tratamientos para la enfermedad.

## *Bibliografía*

Ablin JN, Boguslavski V, Aloush V, Elkayam O, Paran D, Levartovski D, Caspi D, George J. Enhanced adhesive properties of endothelial progenitor cells (EPCs) in patients with SLE. *Rheumatology International* 2010 Mar 7. Epub ahead of print.

Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *The Journal of Rheumatology* 1995; 22(7): 1259-1264.

Ahmad Y, Bruce INN. Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2004; 31(5): 841-843.

Asanuma Y, Chung C, Oeser A, Shintani A, Stanley E, Raggi P, Stein CM. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33 (3): 539-545.

Asanuma Y, Oeser A, Shintani A, Turner E, Olsen N, Fazio S, Linton MF, Raggi P, Stein CM. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2407-2415.

Avouac J, Juin F, Wipff J, Couraud P, Chiocchia G, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008; 67: 1455–1460.

Belhassen L, Carville C, Pelle G, Monin JL, Teiger E, Duval-Moulin AM, Dupouy P, Dubois Rande JL, Gueret P. Evaluation of carotid artery and aortic intima-media thickness measurements for exclusion of significant coronary atherosclerosis in patients scheduled for heart valve surgery. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(7): 1139-1144.

Bernatsky S, Boivin J.-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman D, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S, Gordon C, Bae SC, Isenberg D, Zoma A, Aranow C, Dooley MA, Nived O, Sturfelt G, Steinsson K, Alarcón G, Senécal JL, Zimmer M, Hanly J, Ensworth S, Pope J, Edworthy S, Rahman A, Sibley J, El-Gabalawy H, McCarthy T, St Pierre Y, Clarke A, Ramsey-Goldman R. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54(8): 2550-2557.

Bessant R, Duncan R, Ambler G, Swanton J, Isenberg D, Gordon C, Rahman A. Prevalence of conventional and lupus-specific risk factors for cardiovascular disease in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 55(6): 892-899.

Bjarnegård N, Bengtsson C, Brodzki J, Sturfelt G, Nived O, Länne T. Increased aortic pulse wave velocity in middle aged women with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; 15(10): 644-650.

Bombardier C, Gladman D, Urowitz M, Caron D, Chang CH, the Committee on prognosis studies in SLE. Derivation of the SLE. *Arthritis & Rheumatism* 1992; 35: 630-639.

Boutouyrie P. The references values for arterial stiffness collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: "establishing normal and references values". *European Heart Journal* 2010 June.

Böyum AJ. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1968; 21: 77-89.

Bruce IN, Burns R, Gladman D, Urowitz M. Single photon emission computed tomography dual isotope myocardial perfusion imaging in women with systemic lupus erythematosus. I. Prevalence and distribution of abnormalities. *The Journal of Rheumatology* 2000; 27: 2372-2377.

Bruce IN, Urowitz M, Gladman D, Ibañez D, Steiner G. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48(11): 3159-3167.

Bulkley BH, Roberts W. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. *The American Journal of Medicine* 1975; 58: 243-264.

Cacciapaglia F, Zardi EM, Coppolino G, Buzzulini F, Margiotta D, Arcarese L, Vadacca M, Amoroso A, Afeltra A. Stiffness parameters, intima-media thickness and early

atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2009; 18(3): 249-256.

Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 1246-1252.

Chung CP, Long AG, Solus JF, Rho YH, Oeser A, Raggi P, Stein CM. Adipocytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis. *Lupus* 2009; 18(9): 799-806.

Clancy R, Marder G, Martin V, Belmont HM, Abramson SB, Buyon J. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis & Rheumatism* 2001; 44(5): 1203-1208.

Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *The New England Journal of Medicine* 1991; 324: 1149-1155.

Colombo BM, Murdaca G, Caiti M, Rodriguez G, Grassia L, Rossi E, Indiveri F, Puppo F. Intima-media thickness: a marker of accelerated atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007 ; 1108: 121-126.

Colombo BM, Cacciapaglia F, Puntoni M, Murdaca G, Rossi E, Rodriguez G, Nobili F, Pisciotta L, Bertolini S, Moccetti T, Dentali F, Steidl L, Ciprandi G, Afeltra A, Indiveri F, Puppo F. Traditional and non traditional risk factors in accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of vascular endothelial growth factor (VEGATS Study). *Autoimmunity Reviews* 2009; 8(4): 309-315.

Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *European Heart Journal* 2003; 24(11): 987-1003



De Leeuw K, Smit A, De Groot E, Van Roon A, Kallenberg C, Bijl M. Longitudinal study on premature atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis* 2009; 206: 546-550.

Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, McCune WJ, Kaplan MJ. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood* 2007; 110(8): 2907-2915.

Del Papa N, Cortiana M, Vitali C, Silvestris I, Maglione W, Comina DP, Lucchi T, Cortelezzi A. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35:1323–1328.

Deng XL, Li XX, Liu XY. Comparative study on circulating endothelial progenitor cells in systemic lupus erythematosus patients at active stage. *Rheumatology International* 2010; 30(11): 1429-1436.

Distler J, Allanore Y, Avouac J, Giacomelli R, Guiducci S, Moritz F, Akhmetshina A, Walker UA, Gabrielli A, Müller-Ladner U, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Distler O; EULAR Scleroderma Trials and Research group. EUSTAR statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009; 68: 163–168.

El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, Bernstein RM, Bruce INN. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation* 2004; 110(4): 399-404.

Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP Jr. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 2005; 106(8): 2923-2924.

Elshal M, Abdelaziz A, Abbas A, Mahmoud K, Fathy H, El Mongy S, El-Basyuoni S, Ahmed H, McCoy P. Quantification of circulating endothelial cells in peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients: a simple and reproducible method of assessing endothelial injury and repair. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009; 24(5): 1495-1499.

Esdaile J, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, Du Berger R, Côte R, Grover SA, Fortin PR, Clarke AE, Senécal JL. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2001; 44(10): 2331-2337.

Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2001; 285(19): 2486-2497.

Fischer L, Schlienger R, Matter C, Jick H, Meier C. Effect of Rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 2004; 93: 198-200.

Ford ES, Li C, Cook S, Choi HK. Serum concentrations of uric acid and the metabolic syndrome among US children and adolescents. *Circulation* 2007; 115: 2526–2532.

Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF Jr, Vita JA. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998; 98(15): 1481-1486.

Gladman DD, Urowitz MB. Morbidity in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 1987; 14 (Suppl 13): 223-226.

Gladman DD, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American college of rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39: 363-369.

Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Miranda-Filloy JA, Paz-Carreira J, Martin J, Llorca J. Asymptomatic hyperuricemia and serum uric acid concentration correlate with subclinical atherosclerosis in psoriatic

arthritis patients without clinically evident cardiovascular disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2009; 39(3) :157-162.

Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, Weigel G, Schwarzingier I, Wolozczuk W, Steiner G, Smolen JS. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2005; 111(2): 204-211.

Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Säemann M, Schwarzingier I, Buranyi B, Steiner G, Smolen JS. Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: effect of tumour necrosis factor and glucocorticoid therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007; 66: 1284-1288.

Grisar J, Steiner CW, Bonelli M, Karonitsch T, Schwarzingier I, Weigel G, Steiner G, Smolen JS. Systemic lupus erythematosus patients exhibit functional deficiencies of endothelial progenitor cells. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(10): 1476-1483.

Haider YS, Roberts WC. Coronary arterial disease in systemic lupus erythematosus; quantification of degrees of narrowing in 22 necropsy patients (21 women) aged 16 to 37 years. *The American Journal of Medicine* 1981; 70(4): 775-781.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1685-1695.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 593–600.

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96(12): 4219-4225.

Iglseder B, Cip P, Malaimare L, Ladurner G, Paulweber B. The metabolic syndrome is a stronger risk factor for early carotid atherosclerosis in women than in men. *Stroke* 2005; 36: 1212-1217.

Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Masatsugu K, Becker AE, Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98(20): 2108-2116.

Jaumdally RJ, Goon PK, Varma C, Blann AD, Lip GY. Effects of atorvastatin on circulating CD34+/CD133+/CD45- progenitor cells and indices of angiogenesis (vascular endothelial growth factor and the angiopoietins 1 and 2) in atherosclerotic vascular disease and diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 2010; 267(4): 385-393.

Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H Ikeda U. Therapeutic potencial of endotelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 2006; 4: 59-65.

Jialal I, Devaraj S, Singh U, Huet BA. Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2010; 211(1): 297-302.

Jiménez C, Marco V. Doppler velocity analysis in occlusion and normal carotid arteries. *Cerebrovascular Diseases* 2003; 16 Suppl 2: 21.

Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005; 64B: 1-8.

Kao AH, Wasko M, Krishnaswami S, Wagner J, Edmundowicz D, Shaw P, Cunningham AL, Danchenko N, Sutton-Tyrrell K, Tracy RP, Kuller LH, Manzi S. C-Reactive protein and coronary artery calcium in asymptomatic women with systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. *The American Journal of Cardiology* 2008; 102: 755-760.

Karp I, Abrahamowicz M, Fortin P, Pilote L, Neville C, Pineau C, Esdaile JM. Recent corticosteroid use and recent disease activity: independent determinants of coronary heart disease risk factors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2008; 59(2): 169-175.

Kiani A, Magder L, Petri M. Coronary calcium in systemic lupus erythematosus is associated with traditional cardiovascular risk factors, but not with disease activity. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35: 1300-1306.

Krishnan E, Kwok CK, Schumacher HR, Kuller L. Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome. *Hypertension* 2007; 49: 298–303.

Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk P, Ciolkiewicz M, Sierakowski S. Clinical significance of selected endothelial activation markers in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35: 1307-1313.

Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Modern Rheumatology / The Japan Rheumatism Association* 2009; 19(5): 530-535.

Langenberg C, Bergstrom J, Scheidt-Nave C, Pfeilschifter J, Barrett-Connor E. Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers. *Diabetes Care* 2006; 29: 1363-1369.

Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* 2003; 34(5): 1203-1206.

Lee PY, Li Y, Richards HB, Chan FS, Zhuang H, Narain S, Butfiloski EJ, Sobel ES, Reeves WH, Segal MS. Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56(11): 3759-3769.

Lee S, Singh S, Link K, Petri M. High-Sensitivity C-Reactive Protein as an Associate of Clinical Subsets and Organ Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Arthritis & Rheumatism* 2008; 38: 41–54.

Lehto S, Niskanen L, Ronnemaa T, Laakso M. Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke* 1998; 29: 635–639.

Lima DS, Sato EI, Lima VC, Miranda F Jr, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2002; 29(2): 292-297.

Maksimowicz-McKinnon K, Magder L, Petri M. Predictors of carotid atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 2458-2463.

Manger K, Kusus M, Forster C, Ropers D, Daniel WG, Kalden JR, Achenbach S, Manger B. Factors associated with coronary artery calcification in young female patients with SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003; 62(9): 846-850.

Manzi S, Meilahn E, Rairie J, Conte C, Medsger T Jr, Jansen-McWilliams L, D'Agostino RB, Kuller LH. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with Framingham study. *American Journal of Epidemiology* 1997; 145(5): 408-415.

Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, Kuller LH. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42(1): 51-60.

McMahon M, Hahn B. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus – mechanistic basis of the association. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19: 633-639.

Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 78(4): 805-818.

Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and woman: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 43: 1239-1245.

Moonen JR, de Leeuw K, van Seijen XJ, Kallenberg CG, van Luyn MJ, Bijl M, Harmsen MC. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9(4): R84.

Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, Sangiorgi Z, Dormi A, Rovinetti C, Descovich GC, Puddu P. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *The American Journal of Medicine* 1995; 98(4): 357-364.

Nikpour M, Gladman D, Ibañez D, Bruce IN, Burns R, Urowitz M. Myocardial perfusion imaging in assessing risk of coronary events in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36(2): 288-294.

O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340(1): 14-22.

Oliveras A, Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, Vilaró S, Lloveras J. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *Journal of Human Hypertension* 2008; 22: 183-190.

Panoulas VF, Milionis HJ, Douglas KM, Nightingale P, Kita MD, Klocke R, Elisaf MS, Kitas GD. Association of serum uric acid with cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1466–1470.

Papamichael CM, Lekakis JP, Stamatelopoulos KS, Papaioannou TG, Alevizaki MK, Cimponeriu AT, Kanakakis JE, Papapanagiotou A, Kalofoutis AT, Stamatelopoulos SF. Ankle-brachial index as a predictor of the extent of coronary atherosclerosis and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 2000; 86(6): 615-618.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.

Petri M, Spence D, Bone L, Hochberg M. Coronary artery disease risk factors in the Johns Hopkins lupus cohort: prevalence, recognition by patients and preventive practices. *Medicine* 1992 a; 71(5): 291-302.

Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg M. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Medicine* 1992 b; 93: 513-519.

Petri M, Roubenoff R, Dallal G, Nadeau M, Selhub J, Rosenberg I. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1996; 348: 1120-1124.

Poredos P. Intima-media thickness: indicator of cardiovascular risk and measure of the extent of atherosclerosis. *Vascular Medicine* 2004; 9(1): 46-54.

Rahman P, Urowitz M, Gladman D, Bruce IN, Genest J Jr. Contribution of traditional risk factors to coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 1999; 26(11): 2363-2368.

Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, Chakrabarti A, Richardson BC, Shelden E, McCune WJ, Kaplan MJ. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood* 2004; 103(10): 3677-3683.

Reynolds HR, Buyon J, Kim M, Rivera TL, Izmirly P, Tunick P, Clancy RM. Association of plasma soluble E-selectin and adiponectin with carotid plaque in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis* 2010; 210(2): 569-574.

Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35(9): 1789-1794.

Robak E, Kierstan M, Cebula B, Krawczynska A, Sysa-Jedrzejowska A, Wierzbowska A, Smolewski P, Robak T. Circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18(4):332-341.

Roman M, Shanker B-A, Davis A, Lockshin M, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB, Salmon JE. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2399-2406.



Roman M, Crow M, Lockshin M, Devereux R, Paget S, Sammaritano L, Levine DM, Davis A, Salmon JE. Rate and determinants of progression of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56(10): 3412-3419.

Ross R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340(2): 115-126.

Rubin LA, Urowitz MB, Gladman DD. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *The Quarterly Journal of Medicine* 1985; 55(216): 87-98.

Sabio JM, Vargas-Hitos J, Zamora-Pasadas M, Mediavilla JD, Navarrete N, Ramirez A, Hidalgo-Tenorio C, Jáimez L, Martín J, Jiménez-Alonso J; Grupo Lupus Virgen de las Nieves. Metabolic syndrome is associated with increased arterial stiffness and biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36: 2204-2211.

Sabio JM, Vargas-Hitos JA, Mediavilla JD, Navarrete-Navarrete N, Zamora-Posadas M, Pérez-Vicente S, Hidalgo-Tenorio C, Díaz-Chamorro A, Jáimez L, Jiménez-Alonso J; Grupo Lupus Virgen de las Nieves. Correlation of asymptomatic hyperuricaemia and serum uric acid levels with arterial stiffness in women with systemic lupus erythematosus without clinically evident atherosclerotic cardiovascular disease. *Lupus* 2010; 19(5): 591-598.

Safar ME, Thomas F, Blacher J, Nzietchueng R, Bureau JM, Pannier B, Benetos A. Metabolic syndrome and age-related progression of aortic stiffness. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47: 72-75.

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 948-954.

Sella E, Sato E, Oliveira J, Barbieri A. Myocardial perfusion and coronary disease risk factors in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003 a; 62: 1066-1070.

Sella E, Sato E, Barbieri A. Coronary artery angiography in systemic lupus erythematosus patients with abnormal myocardial perfusion scintigraphy. *Arthritis & Rheumatism* 2003 b; 48(11): 3168-3175.

Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald S, Tracy R, Kuller L, Manzi S. Vascular stiffness in women with systemic lupus erythematosus. *Hypertension* 2001; 37(4):1075-82.

Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Pratt JE, Tracy RP, Kuller LH, Manzi S. Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(1): 151-159.

Shang Q, Tam LS, Li EK, Yip GW, Yu CM. Increased arterial stiffness correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17(12): 1096-1102.

Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49(7): 741-752.

Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European Heart Journal* 2002; 23(5): 376-383.

Spadaccio C, Pollari F, Casacalenda A, Alfano G, Genovese J, Covino E, Chello M. Atorvastatin increases the number of endothelial progenitor cells after cardiac surgery: a randomized control study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2010; 55(1): 30-38.

Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P, Smolen JS. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *British Journal of Rheumatology* 1996; 35(11): 1067-74.

Svenungsson E, Fei GZ, Jensen-Urstad K, de Faire U, Hamsten A, Frostegard J. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* 2003; 12(6): 454-461.

Telles RW, Lanna CC, Ferreira GA, Souza AJ, Navarro TP, Ribeiro AL. Carotid atherosclerotic alterations in systemic lupus erythematosus patients treated at a Brazilian university setting. *Lupus* 2008; 17: 105-113.

Theodoridou A, Bento L, D'Cruz D, Khamashta M, Hughes G. Prevalence and associations of an abnormal ankle-brachial index in systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003; 62: 1199-1203.

Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman R, Kao A, Fitzgerald S, Shook B, Tracy RP, Kuller LH, Brockwell S, Manzi S. Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2008; 58(3): 835-842.

Tso TK, Huang WN, Huang HY, Chang CK. Association of brachial-ankle pulse wave velocity with cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2005; 14(11): 878-883.

Tso TK, Huang HY, Chang CK, Huang WN. A positive correlation between homocysteine and brachial-ankle pulse wave velocity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology* 2006; 25(3): 285-290.

Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Sex differences in uric acid and risk factors for coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 2001; 87: 1411–1414.

Tziomalos K, Sivanadarajah N, Mikhailidis DP, Boumpas DT, Seifalian AM. Increased risk of vascular events in systemic lupus erythematosus: is arterial stiffness a predictor of vascular risk? *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26: 1134-1145.

Umemura T, Soga J, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Nishioka K, Goto C, Teragawa H, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *American Journal of Hypertension* 2008; 21(11): 1203-1209.

Urowitz M, Bookman A, Koehler B, Gordon D. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Medicine* 1976; 60: 221-225.

Urowitz M, Gladman D, Ibañez D, Fortin P, Sánchez-Guerrero J, Bae S, Clarke A, Bernatsky S, Gordon C, Hanly J, Wallace D, Isenberg D, Ginzler E, Merrill J, Alarcon G, Steinsson K, Petri M, Dooley MA, Bruce I, Manzi S, Khamashta M, Ramsey-Goldman R, Zoma A, Sturfelt G, Nived O, Maddison P, Font J, van Vollenhoven R, Aranow C, Kalunian K, Stoll T, Buyon J. Clinical manifestations and coronary artery disease risk factors at diagnosis of systemic lupus erythematosus: data from an international inception cohort. *Lupus* 2007 a; 16: 731-735.

Urowitz M, Ibañez D, Gladman D. Atherosclerotic vascular events in a single large lupus cohort: prevalence and risk factors. *The Journal of Rheumatology* 2007 b; 34: 70-75.

Valdivielso P, Gómez-Doblas J.J, Macias M, Haro-Liger M, Fernández-Nebro A, Sánchez-Chaparro M.A, González-Santos P. Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26: 827-833.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Research* 2001; 89(1): E1-7.

Von Feldt J, Scalzi L, Cucchiara A, Morthala S, Kealey C, Flagg S, Genin A, Van Dyke AL, Nackos E, Chander A, Gehrie E, Cron RQ, Whitehead AS. Homocysteine levels and disease duration independently correlate with coronary artery calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54(7): 2220-2227.

Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42(2): 338-346.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353: 999–1007.

Westerweel PE, Luijten RK, Hoefer IE, Koomans HA, Derksen RH, Verhaar MC. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007; 66(7): 865-870.

Wolak T, Todosoui E, Szendro G, Bolotin A, Jonathan BS, Flusser D, Buskila D, Sukenik S, Abu-Shakra M. Duplex study of the carotid and femoral arteries of patients with systemic lupus erythematosus: a controlled study. *The Journal of Rheumatology* 2004; 31(5): 909-914.

Wu JT, Wu LL. Association of soluble markers with various stages and major events of atherosclerosis. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2005; 35: 240-250.

Yiu KH, Wang S, Mok MY, Ooi GC, Khong PL, Mak KF, Lam KF, Lau CS, Tse HF. Pattern of arterial calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36(10): 2212-2227.

Zardi EM, Afeltra A. Endothelial dysfunction and vascular stiffness in systemic lupus erythematosus: are they early markers of subclinical atherosclerosis? *Autoimmunity Reviews* 2010; 9(10): 684-686.

Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2001; 286(17): 2136-2142.